

Aus der Fachrichtung Medizinische Biochemie und Molekularbiologie

Theoretische Medizin und Biowissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Die Proteinkinase CK2,  
die Glucose-stimulierte Insulinsekretion und  
der spannungsabhängige Calciumkanal Ca<sub>v</sub>2.1**

*Dissertation*

*zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften*

der

Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

2020

vorgelegt von

M.Sc. Rebecca Scheuer

geb. am 10.08.1987 in Neunkirchen/Saar

Tag der Promotion: 19.07.2021

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Claudia Götz  
Prof. Dr. Frank Schmitz

## Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
ADP	Adenosin-Diphosphat
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
Amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
CHX	Cycloheximid
CK2	Proteinkinase CK2
cm	Zentimeter
cpm	<i>counts per minute</i> (Zählimpulse pro Minute)
C-Terminus	Carboxyterminus
CX-4945	Silmitasertib
deion.	deionisiert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Endkonz.	Endkonzentration
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
F <sub>c</sub> -Domäne	crystallisable fragment-Domäne
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
g	Gramm

## Abkürzungsverzeichnis

GSH	Glutathione
GSIS	Glucose-stimulierte Insulinsekretion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinylethanesulfonsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
HSP	Hitzeschockprotein
HVA	<i>high voltage activated</i>
IP	Immunpräzipitat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K <sub>ATP</sub>	ATP-sensitiver Kaliumkanal
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KRB	Krebs-Ringerlösung Bicarbonat
KRBH	Krebs-Ringerlösung Bicarbonat-HEPES
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LVA	<i>low voltage activated</i>
μ	micro
m	milli
M	Molar
mA	Milliampere
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MG132	Proteasom-Inhibitor
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
n	nano
nm	nanometer
NaCl	Natriumchlorid
NP-40	Nonidet P-40

## Abkürzungsverzeichnis

nt	Nukleotid
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS mit 0.1% (v/v) Tween 20
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDX-1 (STF-1)	Pancreatic duodenal Homeobox 1
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q	Quinalizarin: 1,2,5,8-tetrahydroxyanthraquinon
rel.	relative
rH	relative Luftfeuchtigkeit
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNARE	soluble <i>N</i> -ethylmaleimide-sensible factor attachment protein receptors
T	Threonin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBST	TBS mit 0.1% (v/v) Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet <sup>r</sup>	Tetracyclinresistenz
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VDCCs	<i>voltage dependent calcium channels</i> , spannungsabhängige Calciumkanäle
VP	Vorpräzipitat
WT	Wildtyp

## Abkürzungsverzeichnis

z.B.

zum Beispiel

% (v/v)

Volumenprozent

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Summary</b>	<b>2</b>
<b>3. Einleitung</b>	<b>3</b>
3.1 Die Glucose-stimulierte Insulinsekretion, $Ca_v2.1$ und die CK2	3
3.2 Zielsetzung der Arbeit	12
<b>4. Materialien</b>	<b>13</b>
4.1 Geräte, Chemikalien und Enzyme	13
4.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	13
4.1.2 Chemikalien	15
4.1.3 Radiochemikalien	16
4.1.4 Enzyme	16
4.1.5 Experimentelle Kits	17
4.2 Molekulargewichtsmarker	18
4.2.1 DNA-Molekulargewichtsmarker	18
4.2.2 Protein-Molekulargewichtsmarker	18
4.3 Antikörper	19
4.3.1 Primärantikörper	19
4.3.2 Sekundärantikörper	21
4.4 Bakterienstämme	22
4.5 Nährmedien für Bakterien	22
4.6 Zellsystem	22
4.7 Primer	22
4.8 Plasmide	24
4.9 Gereinigte, rekombinante Proteine	25
4.10 Puffer und Lösungen	26
4.11 Computerprogramme	34

<b>5. Methoden</b>	<b>36</b>
5.1 Molekularbiologische Methoden	36
5.1.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
5.1.2 Agarosegelelektrophorese	38
5.1.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	39
5.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	39
5.1.5 Restriktionsverdau von DNA	40
5.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten	40
5.1.7 DNA-Mutagenese	41
5.1.8 DNA-Sequenzierung	42
5.1.9 Erzeugung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	43
5.1.10 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	43
5.1.11 Herstellung von Agar-Selektionsplatten	43
5.1.12 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	44
5.1.13 Induktion der Proteinexpression in <i>E. coli</i> Bakterien	44
5.1.14 Reinigung von rekombinanten GST-Fusionsproteinen	45
5.2 Zellkulturtechniken	46
5.2.1 Kultivieren der Zellen	46
5.2.2 Passagieren der Zellen	46
5.2.3 Einfrieren der Zellen	46
5.2.4 Auftauen der Zellen	47
5.2.5 Behandlung der Zellen mit CK2-Inhibitoren	47
5.2.6 Behandlung der Zellen mit Cycloheximid	48
5.2.7 Behandlung der Zellen mit MG132	48
5.2.8 Ernten der Zellen	48
5.2.9 Transiente Transfektion von Zellen	49
5.3 Proteinchemische und immunologische Arbeitsmethoden	49
5.3.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten zur Proteinanalyse	49
5.3.2 Quantifizierung von Proteinen nach Bradford	50
5.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
5.3.4 Proteinfärbung mit Coomassie-Blau	52
5.3.5 Western Blot Analyse	52
5.3.6 Immunologischer Proteinnachweis	52



5.3.7 Coimmunpräzipitation.....	53
5.3.8 <i>In vitro</i> CK2-Kinaseaktivitätsassay.....	54
5.3.9 Apoptosenachweis durch Spaltung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP).....	55
5.3.10 Bestimmung von Phosphorylierungsstellen mit Peptidfiltern.....	55
5.3.11 <i>In vitro</i> Phosphorylierung.....	55
5.3.12 <i>In vitro</i> GST-pull down Assay.....	56
5.3.13 Autoradiographie.....	57
5.3.14 Peptidkompetitionsassay.....	57
5.3.15 "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" (ELISA).....	57
5.3.16 Messung der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Ionenkonzentration.....	58
5.3.17 RNA-Interferenz.....	59
<b>6. Ergebnisse.....</b>	<b>61</b>
6.1 Untersuchungen der INS-1 832/13 Zelllinie als Zellkulturmodell zur Analyse der Glucose-stimulierten Insulinsekretion.....	61
6.2 Auswirkungen einer CK2-Inhibition auf die Insulinsekretion.....	64
6.3 Auswirkungen einer CK2-Inhibition auf die intrazelluläre $Ca^{2+}$ -Ionenkonzentration.....	68
6.4 Untersuchungen des spannungsabhängigen Calciumkanals $Ca_v2.1$ als mögliches Zielmolekül für die Proteinkinase CK2.....	71
6.4.1 Untersuchung der Phosphorylierung des endogenen $Ca_v2.1$ durch die CK2.....	72
6.4.2 <i>In silico</i> Suche möglicher CK2-Phosphorylierungsstellen im $Ca_v2.1$ .....	74
6.4.3 Untersuchungen der <i>in vitro</i> Phosphorylierung von $Ca_v2.1$ durch die Proteinkinase CK2.....	76
6.4.4 Untersuchungen der Interaktion der CK2 mit $Ca_v2.1$ .....	90
6.4.5 Untersuchungen der endogenen $Ca_v2.1$ Proteinexpression nach CK2-Inhibition.....	96
6.5 Analyse der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Ionenkonzentration nach $Ca_v2.1$ „knockdown“ und Inhibition der CK2.....	102
6.6 Exkurs: Untersuchungen einer Proteinbande bei ca. 100 kDa.....	106
<b>7. Diskussion.....</b>	<b>117</b>

<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>133</b>
-------------------------------------	------------

<b>9. Publikationen.....</b>	<b>148</b>
------------------------------	------------

**Danksagung**

**Lebenslauf**

# 1. Zusammenfassung

Das Hormon Insulin, welches in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas gebildet wird, spielt eine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung des Blutglucosespiegels. Dementsprechend wichtig ist die Regulation der Insulinbiosynthese und -sekretion für eine schnelle Anpassung an den aktuellen Bedarf. Bisherige Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die hochkonservierte, ubiquitär vorkommende Serin-/Threoninkinase CK2 einen negativen Effekt auf diese Regulation ausübt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bringen neue Erkenntnisse über die Rolle der CK2 in der pankreatischen Ratten- $\beta$ -Zelllinie INS-1 832/13. Ich konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit verifizieren, dass die Insulinsekretion in INS-1 832/13 Zellen durch eine CK2-Hemmung gesteigert wird und weiterhin zeigen, dass diese Steigerung durch eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration über einen Influx von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  bedingt ist. Der Anstieg der Insulinsekretion konnte auch in pankreatischen murinen Inseln beobachtet werden. Erstmals konnte in dieser Dissertation der spannungsabhängige Calciumkanal  $\text{Ca}_v2.1$  als ein Zielmolekül für eine Phosphorylierung durch die CK2 identifiziert werden, wobei *in vitro* die Serine an Position 1677, 2362 und 2364 als CK2-Phosphorylierungsstellen identifiziert wurden. Weiterhin konnte ich den  $\text{Ca}_v2.1$  Calciumkanal *in vitro* und *in vivo* als einen Interaktionspartner der CK2 bestätigen und demonstrieren, dass die Interaktion mit beiden Untereinheiten der CK2 erfolgt. Eine Hemmung der CK2 trägt außerdem zur Destabilisierung des  $\text{Ca}_v2.1$  Proteins bei. Durch einen „knockdown“ des  $\text{Ca}_v2.1$  Kanals konnte ich in der vorliegenden Dissertation zum ersten Mal zeigen, dass der stimulierende Effekt einer CK2-Inhibition auf die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration zum Teil auf einen Influx über den  $\text{Ca}_v2.1$  zurück zu führen ist. Letztendlich konnte ich mit den vorliegenden Ergebnissen erstmals auf eine Regulation der Insulinsekretion durch eine CK2-Phosphorylierung des  $\text{Ca}_v2.1$  Calciumkanals hinweisen. Eine CK2-Hemmung stellt damit ein interessantes Target zur Stimulation der Insulinbiosynthese und -sekretion dar und könnte damit dazu beitragen, der Entstehung von Diabetes mellitus entgegenzuwirken und neue Therapiemethoden zu entwickeln.

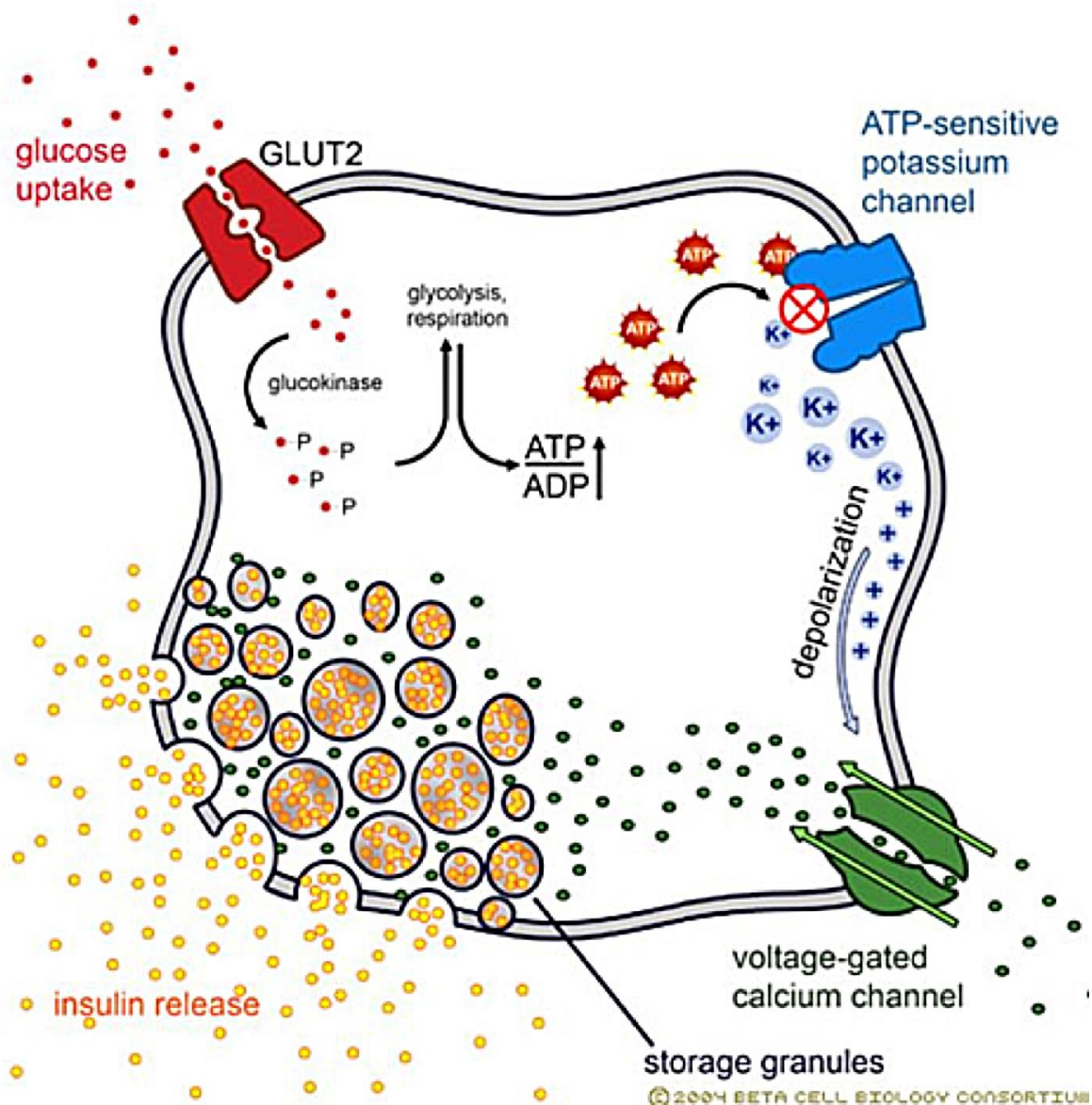
## 2. Summary

Insulin, a peptide hormone which is synthesized in pancreatic  $\beta$ -cells, plays an essential role in maintaining blood glucose levels. Accordingly, the regulation of biosynthesis and secretion of insulin is key to quick adjustments to current needs. Previous findings pointed to the highly conserved, ubiquitously serine-/threonine kinase CK2 for having a negative effect on this regulation. The results of the present work show new insight into the role of CK2 in the cell culture model of the rat pancreatic  $\beta$ -cells INS-1 832/13. As part of my thesis I could verify that insulin secretion in INS-1 832/13 cells increases after CK2 inhibition and that this increase is due to a rise of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  ion concentration by an influx of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . This increase in insulin secretion was also observed in pancreatic mouse islets. For the first time the voltage-dependent calcium channel  $\text{Ca}_v2.1$  was identified as a target for CK2 with serine 1677, 2362 and 2364 as *in vitro* phosphorylation sites for CK2. Furthermore, I demonstrated that  $\text{Ca}_v2.1$  is interacting with CK2 *in vitro* and *in vivo* and that the interaction is with both subunits of CK2. Moreover, the inhibition of CK2 contributes to the destabilization of  $\text{Ca}_v2.1$  protein. In my dissertation I could show for the first time via  $\text{Ca}_v2.1$  knockdown that the stimulating effect of a CK2 inhibition on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  ion concentration is due to an influx via  $\text{Ca}_v2.1$ . In summary, for the first time, the findings described in this thesis point to a regulation of insulin secretion through CK2 phosphorylation of the  $\text{Ca}_v2.1$  calcium channel. Therefore, a CK2 inhibition represents an interesting target for stimulation of insulin biosynthesis and secretion and could be meaningful for the treatment of diabetes.

### 3. Einleitung

#### 3.1 Die Glucose-stimulierte Insulinsekretion, $\text{Ca}_v2.1$ und die CK2

Das Pankreas ist eine lebenswichtige Drüse, welche sowohl exokrine als auch endokrine Funktionen wahrnimmt [1]. Zu den exokrinen Funktionen des Pankreas zählt die Sekretion von Verdauungsenzymen (z. B. Amylase, Lipase, Trypsinogen), sowie die Regulation des Elektrolythaushaltes [2]. Im endokrinen Teil befinden sich die Langerhans-Inseln, welche nur 1-2% der Masse des Pankreas ausmachen [2], aber eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung des Blutglucosespiegels spielen [3]. Die Langerhans-Inseln setzen sich zusammen aus fünf verschiedenen Zelltypen, die unterschiedliche Hormone produzieren: Insulin-sezernierende  $\beta$ -Zellen (60-90%), Glukagon produzierende  $\alpha$ -Zellen (15-20%), Somatostatin produzierende  $\delta$ -Zellen (3-10%), PP-Zellen welche das pankreatische Polypeptid sezernieren (3-5%) und Ghrelin produzierende  $\varepsilon$ -Zellen (1%) [2, 4]. Durch die Abgabe dieser Hormone, wobei Glucagon und Insulin als Gegenspieler die Hauptrollen spielen, wird der Blutglucosespiegel reguliert und bei  $< 6,1 \text{ mmol/l}$  gehalten [5]. Ist der Blutglucosespiegel zu niedrig, so sezernieren die  $\alpha$ -Zellen Glukagon, welches die Glykogenolyse und die Gluconeogenese stimuliert [6]. Pankreatische  $\beta$ -Zellen agieren als Glucosesensoren und sorgen dafür, dass bei einem zu hohen Blutglucosespiegel Insulin synthetisiert und sezerniert wird. Insulin wiederum stimuliert die Glucoseaufnahme aus dem Blut in Fettgewebe und Muskeln und inhibiert die Gluconeogenese und Glykogenolyse [7]. Der Ablauf der Glucose-stimulierten Insulinsekretion (GSIS) ist in Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Glucose-stimulierten Insulinsekretion (GSIS) in einer β-Zelle** (<https://slideplayer.com/slide/9237934/>). Ein Anstieg des Blutzuckerspiegels führt zu einer Aufnahme von Glucose über den GLUT2 Transporter in die β-Zelle. Dort wird Glucose durch die Glucokinase zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert was zu der Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) in der Atmungskette führt. Durch den ATP Anstieg schließen ATP-sensitive Kaliumkanäle und es kommt zu einer Depolarisation der Plasmamembran. Dies führt zu einem Öffnen von spannungsabhängigen Calciumkanälen. Durch den darauffolgenden Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die β-Zelle kommt es zu einem Transport von Insulinvesikeln zur Membran und schließlich zur Exozytose von Insulin.

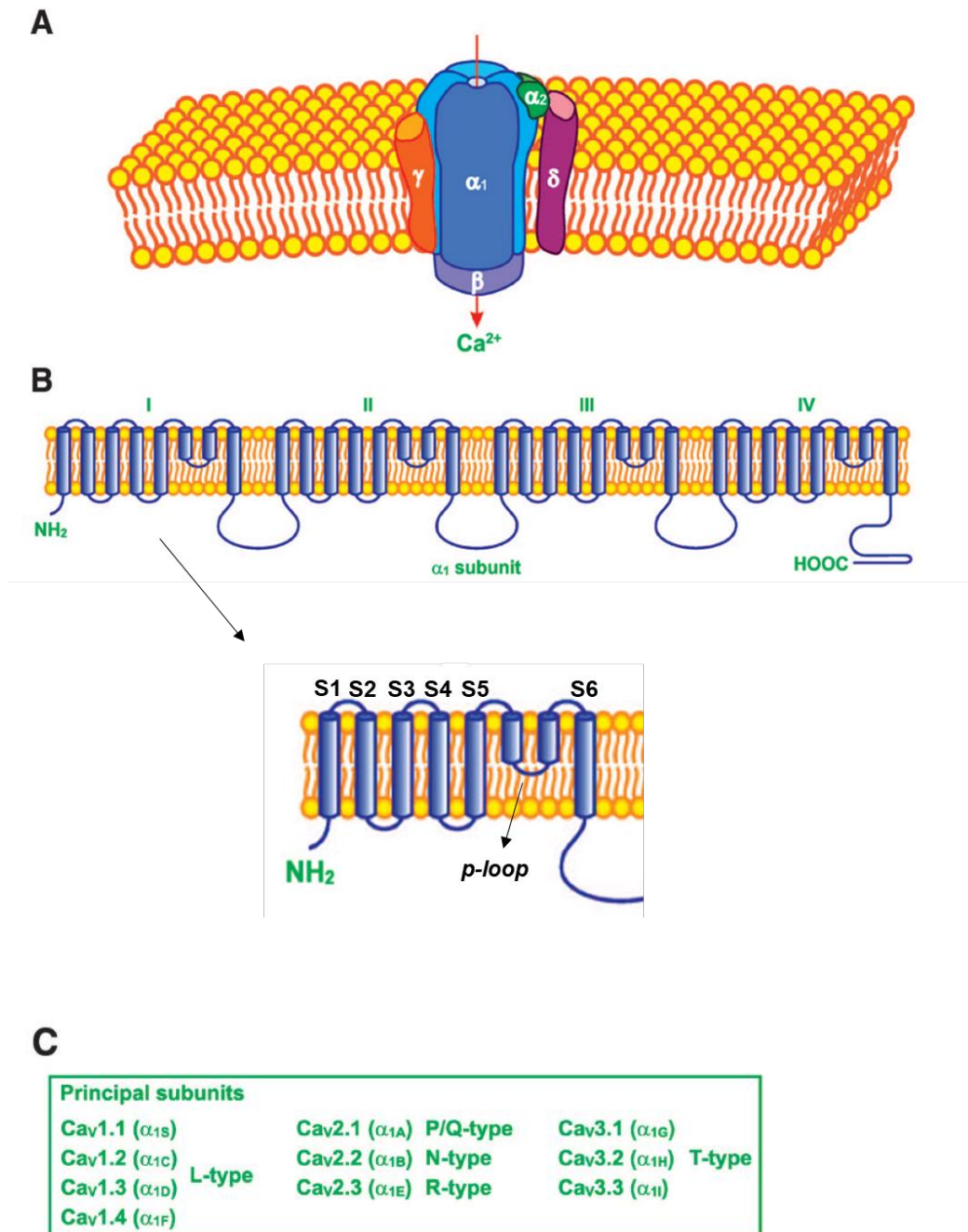
Steigt die Konzentration von Glucose im Blut über 7 mM so wird Glucose über einen Glucose-Transporter (GLUT2 in Nagetieren, GLUT1 im Menschen) [3, 8, 9] in die β-Zelle aufgenommen und dort durch das Enzym Glucokinase zu Glucose-6-phosphat umgewandelt,

womit ein essentieller Schritt der Glykolyse erfolgt. Die Expression von Insulin, GLUT2 und auch die Expression der Glucokinase werden durch den Transkriptionsfaktor PDX-1 reguliert [10]. Die phosphorylierte Glucose wird im Citratzyklus und in der mitochondrialen Atmungskette weiter verstoffwechselt was letztendlich zu einem Anstieg des intrazellulären ATP/ADP-Verhältnisses führt [11, 12]. Durch das veränderte Verhältnis kommt es zu einer Schließung von ATP-sensitiven  $K^+$ -Kanälen ( $K_{ATP}$ ) [2, 13]. Dadurch entsteht ein Membranpotential [9], welches zum Öffnen von spannungsabhängigen Calciumkanälen (VDCCs) führt, wodurch Calcium in die Zelle einströmt. Der Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Ionenkonzentration stimuliert die Freisetzung von Insulin aus Vesikeln über Exozytose [11–14]. Die Exozytose selbst wird unter anderem vermittelt durch SNARE-Proteine (engl. Abkürzung: soluble *N*-ethylmaleimide-sensible factor attachment protein receptors) welche an der Zellmembran lokalisiert sind [9]. Die Interaktion von SNARE-Proteinen mit anderen regulatorischen Proteinen (z.B.: Synaptotagmin, Rab3A) ermöglicht schließlich die Fusion von Insulinhaltigen Vesikeln und der Membran [2]. Durch den initialen Glucosestimulus wird nicht nur die Insulinsekretion induziert, es erfolgt auch eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die unter anderem die Transkription des Insulins initiieren [15]. Kommt es zu Fehlfunktionen der GSIS, so kann dies zum Krankheitsbild des Diabetes mellitus führen. Dabei ist der Blutzuckerspiegel des Betroffenen chronisch erhöht [16]. Unbehandelt kann die Krankheit unter anderem zu Blindheit, Neuropathien, Dysfunktion der Nieren, Verlust der Gliedmaßen und generell zu einer verminderten Lebenserwartung führen [16]. Als Hauptformen werden Diabetes mellitus Typ 1 (10 – 15% der Betroffenen) und Typ 2 (90% der Betroffenen) unterschieden, es gibt allerdings noch weitere Unterformen. Bei Typ 1 werden die  $\beta$ -Zellen durch eine Autoimmunreaktion zerstört, wodurch ein absoluter Insulinmangel folgt. Typ 2 Diabetes mellitus ist charakterisiert durch unterschiedlich stark ausgeprägte Insulinresistenzen und einen Verlust der  $\beta$ -Zell Funktion was schließlich zur Hyperglykämie führt bedingt ist [16–18].

Spannungsabhängige Calciumkanäle (VDCCs) vermitteln den  $Ca^{2+}$ -Ionen Einstrom in die Zelle. Dort dient  $Ca^{2+}$  als second messenger und initiiert zelltypabhängig unterschiedliche zelluläre Ereignisse wie zum Beispiel die Sekretion von Hormonen oder Neurotransmittern, Zellmigration, Gentranskription und Muskelkontraktion [19, 20]. Die VDCCs spielen auch in den  $\beta$ -Zellen eine zentrale Rolle und sind dabei nicht nur von großer Bedeutung für die Insulinsekretion [14, 21], sondern auch für die Entwicklung, die Reifung, das Überleben, das Wachstum und den Tod der  $\beta$ -Zelle [12, 22–24]. Die Weiterleitung des elektrischen Signals in unterschiedlichen Zelltypen in Form von  $Ca^{2+}$ -Ionen erfordert unterschiedliche Subtypen spannungsabhängiger Calciumkanäle. Aufgrund der Spannungssensitivität unterscheidet man zunächst zwischen zwei Typen: LVA-Kanäle (low voltage-activated) und HVA-Kanäle (high voltage-activated). Diese werden weiter unterschieden aufgrund ihrer Untereinheiten

und Ihrer biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften [25]. Der L-Typ ( $\text{Ca}_v1.1$ ,  $\text{Ca}_v1.2$ ,  $\text{Ca}_v1.3$  und  $\text{Ca}_v1.4$ ), der P/Q-Typ ( $\text{Ca}_v2.1$ ), der N-Typ ( $\text{Ca}_v2.2$ ) und der R-Typ ( $\text{Ca}_v2.3$ ), gehören alle zu den HVA-Kanälen.  $\text{Ca}_v3.1$ ,  $\text{Ca}_v3.2$  und  $\text{Ca}_v3.3$  bilden den T-Typ und gehören zu den LVA-Kanälen [26–28]. VDCCs sind aus verschiedenen Untereinheiten aufgebaut, die zusammen einen funktionellen Kanal bilden (Abbildung 2 A). Die  $\alpha_1$ -Untereinheit bildet den Spannungssensor und die Ionen-Pore und ist hauptsächlich verantwortlich für die biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften der Kanäle [19]. Sie ist aufgebaut aus vier homologen Abschnitten mit je sechs Transmembransegmenten (S1 - S6) und einem *p-loop* zwischen S5 und S6 (Abbildung 2 B). Die Segmente S5 und S6 bilden zusammen mit dem *p-loop* den Ionenkanal, die S4 Segmente sind positiv geladen und bilden den Spannungssensor [19]. Die  $\text{Ca}_v\beta$ -,  $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ - und die  $\text{Ca}_v\gamma$ -Untereinheit spielen unter anderem eine Rolle beim Transport, der Expression und der Steuerung des Kanals [27–29]. In Säugetieren wurden zehn Gene für die  $\alpha_1$ -Untereinheit identifiziert, für die  $\beta$ - und die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit jeweils 4 und für die  $\gamma$ -Untereinheit 8 Gene (Abbildung 2 C) [30]. Die für die  $\alpha_1$ -Untereinheit codierenden Gene umfassen eine Länge von mindestens 250 kb und besitzen bis zu 50 Exon-Intron Grenzen [30, 31]. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass jedes  $\text{Ca}_v\alpha_1$ -Gen zumindest 10 Stellen für alternatives Splicing besitzt, was zu einer riesigen Anzahl an Proteinen durch unterschiedliche Splicevarianten führen würde [32].





**Abbildung 2 verändert nach Yang und Berggren [33]: Übersicht über den Aufbau spannungsabhängiger Calciumkanäle. A:** Schematische Darstellung der Anordnung der Untereinheiten von spannungsabhängigen Calciumkanälen in der Plasmamembran. **B:** Prognostizierte Topologie der  $\alpha_1$ -Untereinheit von spannungsabhängigen Calciumkanälen. **C:** Nomenklatur der  $\alpha_1$ -Untereinheit von spannungsabhängigen Calciumkanälen.

Wie zuvor erwähnt spielen spannungsabhängige Calciumkanäle (VDCCs) eine zentrale Rolle bei der Insulinsekretion [14, 21, 34]. Die  $\beta$ -Zellen von unterschiedlichen Spezies und Zelllinien exprimieren unterschiedliche Kombinationen an VDCCs (Tabelle 1) [33–35]. Der L-Typ-Kanal ( $\text{Ca}_v1.2$  und  $\text{Ca}_v1.3$ ) und der P/Q-Typ-Kanal ( $\text{Ca}_v2.1$ ) sind dabei in allen Spezies vorhanden

[12, 23, 34–36] und nehmen die Hauptrollen bei der Insulinsekretion ein [34–37], wobei der L-Typ bei der Generierung des Aktionspotentials eine Rolle spielt und der  $\text{Ca}^{2+}$  Influx über den  $\text{Ca}_v2.1$  (P/Q-Typ) wichtig für die Exozytose der Insulinhaltigen Vesikel ist [34]. Der  $\text{Ca}_v2.1$  wurde in unterschiedlichen Zelllinien [33, 38–41], unter anderem in den INS-1 Zellen, identifiziert [42]. Der  $\text{Ca}_v2.1$  stellt nach einer Stimulation mit Glucose den zweitwichtigsten Weg für den Influx von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen dar. Seine Relevanz wird auch durch die kurze Überlebensfähigkeit von  $\text{Ca}_v2.1$  „knockout“ Mäusen verdeutlicht [43]. In humanen  $\beta$ -Zellen ist er für 45% des gesamten  $\text{Ca}^{2+}$  Stroms verantwortlich und seine Inhibition hat eine Reduktion der GSIS um 60-70% zur Folge [34]. Daher ist es auch nicht überraschend, dass bei  $\text{Ca}_v2.1$  Genmutationen eine hohe Häufigkeit von Typ 2 Diabetes mellitus beobachtet wird [44]. Jegliche Veränderung von VDCCs (Mutationen, Expression, Aktivität oder der Anzahl in der Membran) kann zu einer Dysfunktion von  $\beta$ -Zellen führen [30, 45, 46], wobei eine Hochregulation der Aktivität oder Anzahl von spannungsabhängigen Calciumkanälen der  $\beta$ -Zelle auch in einer erhöhten Exozytose von Insulin resultieren kann [30, 47, 48]. Die Hochregulation von VDCCs stellt damit einen potentiellen Weg zur Behandlung von Diabetes mellitus dar. Allerdings führt eine Hyperaktivierung von  $\text{Ca}_v$  Kanälen auch zum Tod der  $\beta$ -Zellen [49, 50]. Die Identifikation von Faktoren, welche die Aktivität und Expression von VDCCs beeinflussen, ist somit wichtig für ein besseres Verständnis der Regulationsmechanismen der Insulinsekretion und könnte auch bei der Entwicklung neuer Therapien für Diabetes mellitus von Nutzen sein.

**Tabelle 1 [33]: Spannungsabhängige Calciumkanäle in pankreatischen  $\beta$ -Zellen und Inselzellen.**

Origin	Cav Channel mRNA						Protein						Current				
	Cav1.2	Cav1.3	Cav2.1	Cav2.2	Cav2.3	Cav3.1	Cav1.2	Cav1.3	Cav2.1	Cav2.2	Cav2.3	Cav3.1	L	P/Q	N	R	T
Human $\beta$ -cell or islet	+	+	+						+		+		+	+	–		+
Rat $\beta$ -cell or islet	+	+	+	+	+	+			+				+	+	?		+
Mouse $\beta$ -cell or islet	+	+	+				+	+					+	+	–	+	–
Hamster HIT-15T	+	+	+				+						+		?		?
Rat INS-1	?	+	+	+	+	+	–	+	+		+		+	+	?	+	+
Rat RINm5F	+	+	+				+	+	+				+	+	?		+
Mouse MIN6	+						+						+				
Mouse $\beta$ TC-3	+	+		+	+		+						+				

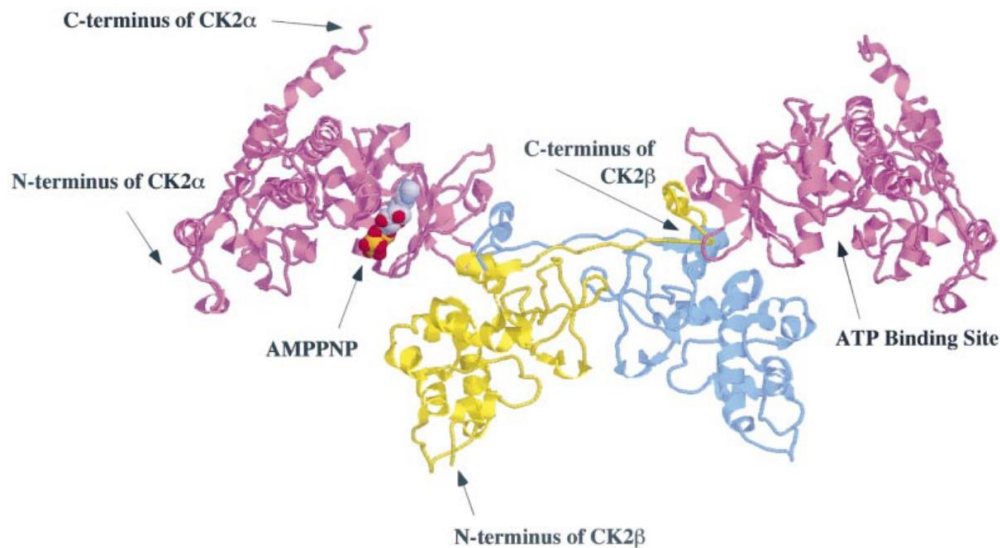
$\text{Ca}_v$  channel, voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel; +, positive; –, negative; ?, controversial.

Posttranslationale Modifikationen stellen einen essenziellen Mechanismus zur Kontrolle und Expression der Funktion von Ionenkanälen dar [51]. Dazu gehören Phosphorylierungen, die

zu den wichtigsten Regulationsmechanismen in der Zelle gehören. Die Reaktion, bei der eine Phosphorylgruppe reversibel an ein Protein angehängt wird, wird durch entsprechende Proteinkinasen katalysiert. Die pankreatische  $\beta$ -Zelle enthält eine Vielfalt an Proteinkinasen und Phosphatasen [30], welche einen großen Einfluss auf die Insulinsekretion nehmen. Das Ausmaß und die Richtung der Einflussnahme von Phosphorylierungen auf die Exozytose scheint dabei stark von dem Stimulus der Sekretion und auch von der Spezies bzw. Zelllinie abzuhängen [52, 53]. Zielmoleküle für Phosphorylierungen stellen unter anderem die spannungsabhängigen Calciumkanäle dar. Bei diesen besitzt die  $\text{Ca}_v\alpha_1$ -Untereinheit mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen [30], was sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden konnte [19, 54, 55]. Mehrere Studien haben zu der Hypothese geführt, dass die Wahrscheinlichkeit des Öffnens von Calciumkanälen von ihrem Phosphorylierungsstatus abhängig ist [56–58]. Der L-Typ Calciumkanal ist ein Beispiel für die Regulation von VDCCs durch Proteinphosphorylierung. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass der Kanal durch Proteinkinasen wie Proteinkinase A [47, 55, 59, 60], Proteinkinase C [61–64], oder CK2 [62, 65–67] phosphoryliert und beeinflusst werden kann. Allerdings sind nur wenige Aminosäuren in den Kanälen identifiziert worden, welche durch diese Kinasen phosphoryliert werden [54, 60, 65, 66].

Die Proteinkinase CK2, die erstmals 1954 beschrieben (damals Casein Kinase 2) wurde [68], ist eine hoch konservierte, ubiquitäre Serin-/Threoninkinase mit der minimalen Konsensussequenz S/TxxD/E. Neben den Aminosäuren Serin und Threonin ist sie ebenfalls in der Lage Tyrosin zu phosphorylieren [69]. Das phosphorylierte Aminosäure liegt dabei bevorzugt in einer sauren Umgebung [70]. Anstelle des Aspartats oder des Glutamats in Position n+3 kann auch ein Phosphoserin bzw. Phosphothreonin stehen, was zu einer hierarchischen Phosphorylierung des Substrats durch die CK2 führt. Das bedeutet, dass die Phosphorylierung der zweiten AS erst nach der Phosphorylierung der ersten AS möglich ist [71]. Das CK2-Holoenzym ist aus zwei katalytischen Untereinheiten (42 kDa  $\text{CK2}\alpha$  oder 38 kDa  $\text{CK2}\alpha'$ ) und zwei nicht-katalytischen Untereinheiten (26 kDa  $\text{CK2}\beta$ ) in unterschiedlichen Kombinationen als Heterotetramer aufgebaut [72, 73]. Die  $\beta$ -Untereinheit ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* autophosphoryliert [74]. Die beiden katalytischen Untereinheiten werden durch die  $\beta$ -Untereinheiten verbunden (Abbildung 3) [75, 76], wobei die Untereinheiten auch unabhängig voneinander vorkommen und individuelle Funktionen ausüben [77–86]. Pinna et al. [87] unterteilte die Substrate der CK2 Proteinkinase in drei verschiedene Klassen. Klasse I sind Substrate, die sowohl durch die  $\text{CK2}\alpha$ - oder  $\text{CK2}\alpha'$ -Untereinheiten als auch durch das Holoenzym phosphoryliert werden. Die Substrate der Klasse II werden nur durch die freien  $\text{CK2}\alpha$ - oder  $\text{CK2}\alpha'$ -Untereinheiten phosphoryliert und die Klasse III Substrate werden nur durch das CK2-Holoenzym phosphoryliert. Die CK2 gilt als konstitutiv aktiv und hat die

charakteristische Eigenschaft, dass sie ATP ebenso effektiv wie GTP als Phosphatdonor verwenden kann (duale Cosubstratspezifität) [73, 88–91].



**Abbildung 3: [72] Struktur der Proteinkinase CK2.** Die katalytischen  $\alpha$ -Untereinheiten sind in lila dargestellt. Die  $\beta$ -Untereinheiten sind in gelb und blau gezeigt. Die N- und C-Termini der CK2 $\alpha$  und CK2 $\beta$  sind exemplarisch an einer Untereinheit durch Pfeile gezeigt.

Die CK2-Untereinheiten sind für die Embryonalentwicklung essentiell, was durch CK2 $\alpha$  „knockout“ Versuche bei Mäusen gezeigt werden konnte [81, 92]. Es sind über 400 Substrate und Interaktionspartner für die CK2 bekannt, dazu gehören unter anderem Transkriptionsfaktoren, DNA/RNA Struktur beeinflussende Proteine, Signalproteine (z. B.: Calcium-bindende Proteine), Proteinkinasen und Phosphatasen [73, 86, 88]. Dadurch ist CK2 in die Zellproliferation, Apoptose, DNA Reparatur, Zellentwicklung und -differenzierung, Genexpression, Angiogenese, den Zellzyklus, und in die Regulation des Metabolismus [93–102] involviert. Weiterhin ist die CK2 am Transport von Metallionen [103, 104] beteiligt. Zu Ihren Substraten gehören unter anderem das Zink Transporter Protein [105], der epitheliale Natriumkanal (ENaC) [106] und der spannungsabhängige Calciumkanal Ca<sub>v</sub>1.2 [66]. In Tumorzellen spielt die CK2 als anti-apoptotische Kinase eine wichtige Rolle und wird als potentiell Target in der Tumorthherapie untersucht [107–110]. Die Kinase ist sowohl nukleär als auch cytoplasmatisch lokalisiert und wurde auch als Ektokinase beschrieben [111–114]. Die Ektophosphorylierung ist eine reversible Phosphorylierung extrazellulärer Domänen, wie sie zum Beispiel Ionenkanäle besitzen.

Es gibt Anhaltspunkte für eine Rolle der CK2 beim Kohlenhydratstoffwechsel bzw. in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle, wobei bisher nur wenige konkrete Substrate identifiziert wurden [97, 100, 115, 116]. Beispielsweise phosphoryliert sie die Glykogensynthase und die Phosphoglucose-Isomerase, was zu einer verminderten Aktivität dieser Enzyme führt [117, 118]. Auch der Insulinrezeptor und das Insulinrezeptor-Zielprotein Insulinrezeptorsubstrat 1 (Irs1) stellen Substrate für die CK2 dar [115, 116]. In der  $\beta$ -Zelle selbst wird PDX-1, der Haupttranskriptionsfaktor des Insulins durch CK2 phosphoryliert, was zum einen zu einer Reduktion seiner Aktivität [97] und zum anderen zu seiner Destabilisierung und seinem proteasomalen Abbaus führt [119]. Durch die PDX-1 Phosphorylierung nimmt die CK2 auch Einfluss auf die Insulintranskription und ihre Hemmung hat deren Steigerung zur Folge. Rui, Götz und Montenarh [120] konnten weiterhin zeigen, dass die Insulinsekretion durch eine Inhibition der CK2 in pankreatischen  $\beta$ -Zellen (MIN6) gesteigert ist. Darüber hinaus kommt es nach einer Insulinbehandlung von  $\beta$ -Zellen zu einer erhöhten CK2-Aktivität [120]. Nach einer Zugabe von Glucose findet eine Translokation der CK2-Untereinheiten in den Zellkern der  $\beta$ -Zelle statt [121]. Das Gen für Insulin wird, abhängig von der PDX-1 Phosphorylierung, durch die CK2 reguliert [120]. Rossi et al. [122] postulieren, dass eine Inhibition der CK2 eine erhöhte Insulinsekretion zur Folge hat, die durch den muskarinischen  $M_3$ -Acetylcholinrezeptor ( $M_3R$ ) vermittelt wird. Acetylcholin fördert die Insulinsekretion teilweise über Aktivierung von  $M_3R$  [123, 124], der ein Substrat für die CK2 darstellt [125]. Aufgrund dieser Beobachtungen scheint die CK2 einen negativen regulatorischen Effekt auf die Glucose-stimulierte Insulinbiosynthese und -sekretion zu haben, womit sie ein interessantes Zielmolekül für neue Therapieansätze in der Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 darstellen würde. Einen möglichen Regulationsmechanismus stellt die CK2-vermittelte Phosphorylierung eines spannungsabhängigen Calciumkanals dar. Die Phosphorylierung könnte einen veränderten  $Ca^{2+}$ -Ionen Influx zur Folge haben, was wiederum die Insulinsekretion beeinflussen würde. Somit würde die CK2 über die Regulation eines Calciumkanals indirekt auch die Insulinsekretion steuern.

### 3.2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, die Rolle der Proteinkinase CK2 bei der Glucose-stimulierten Insulinsekretion in  $\beta$ -Zellen des Pankreas näher zu untersuchen. Dazu soll zunächst mittels eines ELISA überprüft werden ob auch in der  $\beta$ -Zelllinie INS-1 832/13 die Insulinsekretion nach CK2-Inhibition gesteigert wird. Im Anschluss daran soll mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen untersucht werden, ob die gemachte Beobachtung durch eine Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration bedingt ist und ob die mögliche Veränderung auf intra- oder extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  zurückzuführen ist. Im nächsten Schritt, soll mit Hilfe von Phosphorylierungsassays und Phosphorylierungsmutanten festgestellt werden, ob der spannungsabhängige Calciumkanal  $\text{Ca}_v2.1$  ein mögliches Zielmolekül für die CK2 darstellt und die konkreten CK2-Phosphorylierungsstellen identifiziert werden. Zur Untersuchung des  $\text{Ca}_v2.1$  Kanals als potentieller Interaktionspartner der CK2 sollen GST pull-down Analysen durchgeführt werden. Durch immunologische Proteinnachweise soll ebenfalls überprüft werden, ob und inwiefern eine CK2-Phosphorylierung beziehungsweise eine Hemmung der CK2 den Proteingehalt, die Stabilität und den Abbau von  $\text{Ca}_v2.1$  beeinflusst. Schließlich soll mit Hilfe von siRNA-Experimenten und Fluoreszenzmessungen eine Verbindung zwischen der potentiellen Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration nach CK2-Hemmung und dem  $\text{Ca}_v2.1$  Kanal nachgewiesen werden. Zusammenfassend sollen die beschriebenen Experimente helfen, den Wissensstand bezüglich der Rolle der CK2 bei der Glucose-stimulierten Insulinsekretion zu erweitern und damit zu einer möglichen Therapie von Diabetes mellitus durch CK2-Hemmung beitragen zu können.

## 4. Materialien

### 4.1 Geräte, Chemikalien und Enzyme

#### 4.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

2 ml/5 ml/10 ml Einmalspritze Injekt® Solo	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
1.5 ml/2 ml/ 5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
15 ml/50 ml Röhrchen mit Schraubverschluss	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
6-well-Zellkulturplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
96-Loch Platten weiß Nunc®	Sigma-Aldrich, München
100-mm/60-mm Kulturschalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Amersham™ Hybond™ PVDF-Membran	GE Healthcare GmbH, Solingen
Autoklav Varioklav® 400	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Beckman J2-HS Kühlzentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Beckman L-60 Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Western Blot Inkubationsboxen	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Brutschrank Heraeus 6000 mit CO <sub>2</sub> -Begasung	Heraeus Inc., Hanau
charge-couple device (CCD) Kamera	TILL Photonics, Kaufbeuren
CoolCell LX	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Corex®-Röhrchen	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham
Deckgläschen rund, (25 mm)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Elektrophoresekammer SE250 Mighty Small	Hoefer Inc., Holliston
Eppendorf Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5415C	Eppendorf AG, Hamburg
Geltrockner	Fröbel Labortechnik, Lindau
Glasplatten für Elektrophorese	Hoefer Inc., Holliston
Feinwaage Kern 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Filterpapier 3MM	Whatman, Kent
Halbmikroküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Hamilton MICROLITER Spritze	Hamilton, Bonaduz
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf AG, Hamburg
Infinite M200 Pro TECAN Reader	Sigma-Aldrich, München
Inkubator	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Kühlzentrifuge Sigma 4K10	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Labor-Glasware	Schott, Mainz

Magnetrührer MR3000, MR3002	Heidolph, Schwabach
Milli-Q Plus Wasserfiltrations-Reinigungssystem	Merck Millipore, Darmstadt
Nucleobond® AX 100-Säulen	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
P81 Ionenaustausch-Filterpapier	Whatman, Kent
Parafilm M	Pechiney, Plastic Packaging, Chicago
PCR Thermal Cycler MJ Mini	BioRad, München
Petrischalen 94 mm	Greiner, Nürtingen
pH-Meter, pH537	WTW, Weilheim
Pipetten (1000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl, 2.5 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe
Pipette Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Powergeräte	Pharmacia Biotech Inc., Piscataway
Röntgenfilm (AGFA Cronex 5)	AGFA-Gevaert, Belgien
Röntgenfilmentwicklermaschine	AGFA-Gevaert, Belgien
Sterilbank LaminAir® HBB 2448	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Semi-dry Elektro-Blotter Maxi 20 x 20cm	STARLAB GmbH, Hamburg
Szintillationsanalysator 190S AB/LA	Canberra-Packard GmbH, Dreieich
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Thermoschüttler Certomat® H	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Ultraschallbad Transonic 460	Elma Schmidbauer GmbH, Singen
Branson Sonifier Cell Disruptor B15	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Universal Hood II-System	BioRad, München
UV-Quarzküvette 10 mm	Hellma, Müllheim
UV-Transilluminator 302 nm	Bachofer GmbH, Reutlingen
UV-visible Spektrophotometer	Amersham Bioscience, München
Ultrospec 2100 pro	
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich
Waage Sartorius MC1 Laboratory	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	GFL Laborgeräte, Burgwedel
Zeiss Mikroskop Axiovert 100	Carl Zeiss AG, Oberkochen



#### 4.1.2 Chemikalien

6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Waltham
10x Tango Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Acrylamid-Stammlösung Rotiphorese® Gel30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ampicillin	Serva, Heidelberg
APS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad, München
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Complete™ Proteaseinhibitor Cocktail, EDTA-frei	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G250 und R250	Boehringer, Ingelheim
CX-4945 (Silmitasertib)	Selleckchem, Houston
Cycloheximid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Desoxyribonucleosidtriphosphat (dNTP) Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham
DharmaFECT1	Dharmacon, Colorado
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt
DTT	Sigma-Aldrich, München
EDTA	Pharmacia Biotech, Schweden
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
FCS	Biochrom GmbH, Berlin
Fura 2-AM	Thermo Fisher Scientific, Waltham
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham
GeneRuler 50 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Glutathion	Sigma-Aldrich, München
Glutathion-Sepharose	GE Healthcare GmbH, Solingen
Glycerin	Zentrales Chemikalienlager, Saarbrücken
LB-Medium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
MG132	ENZO life sciences, Lörrach
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, München
Nonidet® P-40 (NP-40)	Fluka BioChemika, Schweiz
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham
PhosSTOP™ Phosphataseinhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Fisher Scientific, Waltham

Protein G-Sepharose	Amersham Biosciences AB, Uppsala
Quinalizarin	Labotest OHG, Niederschöna
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
RPMI 1640-Medium	Life Technologies, Darmstadt
RPMI 1640-Medium ohne Glucose	Life Technologies, Darmstadt
Sepharose CL-4B	GE Healthcare, Freiburg
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham
SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tetracyclin	MP Biomedicals, Heidelberg
Triton® X-100	Merck, Darmstadt
TurboFect™ Transfektionsreagenz	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Tween® 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Verschiedene gewöhnliche Laborchemikalien	Merck KGaA, Darmstadt; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen; Carl Roth GmbH, Karlsruhe; Fischer, Saarbrücken

#### 4.1.3 Radiochemikalien

[ <sup>32</sup> P]-γ-ATP (10 µCi/µl)	Hartmann Analytic, Braunschweig
[ <sup>32</sup> P]-α-GTP (10 µCi/µl)	Hartmann Analytic, Braunschweig
[ <sup>35</sup> S]-Methionin (10 µCi/µl)	Hartmann Analytic, Braunschweig

#### 4.1.4 Enzyme

<i>BamHI</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham
CK2-Holoenzym	Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Montenarh, Universität des Saarlandes
CK2α	Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Montenarh, Universität des Saarlandes
<i>EcoRI</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham

Phusion HF DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham
T4 DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Trypsin	Biochrom, Berlin
<i>XhoI</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham

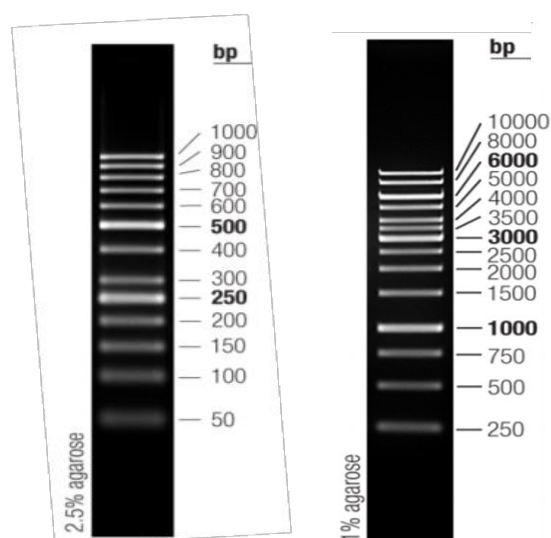
#### 4.1.5 Experimentelle Kits

GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Insulin Rat ELISA Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham
NucleoBond® Plasmid DNA Purification Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Q5 Site-directed Mutagenesis Kit	New England Biolabs, Frankfurt/Main
TnT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems	Promega, Mannheim

## 4.2 Molekulargewichtsmarker

### 4.2.1 DNA-Molekulargewichtsmarker

Zur Größenbestimmung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten auf Agarosegelen wurde in der vorliegenden Dissertation der GeneRuler 50 bp DNA Ladder (50-1000 bp, Abbildung 4, links) und der GeneRuler 1 kb DNA Ladder (250-10000 bp, Abbildung 4, rechts) der Firma Thermo Fisher verwendet. Für die Analyse wurden 8 µl des jeweiligen Markers mit einer Konzentration von 0.5 µg/µl eingesetzt.

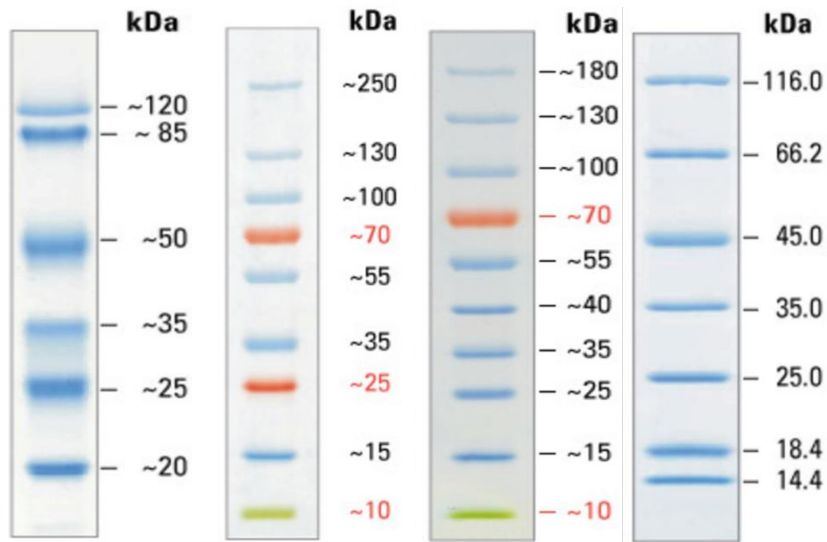


**Abbildung 4:** In der Arbeit verwendete DNA-Molekulargewichtsmarker. **Links:** GeneRuler 50 bp DNA Ladder, 50—1000 bp, Thermo Fisher. **Rechts:** GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 250-10000 bp, Thermo Fisher.

### 4.2.2 Protein-Molekulargewichtsmarker

Zur Überprüfung und Darstellung der Proteinauftrennung während der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und zur Verifizierung des Transfers der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde in der vorliegenden Arbeit der Pierce™ Prestained Protein MW Marker (20-120 kDa) von Thermo Fisher, der PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (10-250 kDa) von Thermo Fisher und der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10-180 kDa) verwendet. Die Proteine des Markers sind kovalent an einen blauen Chromophor gekoppelt. Wurde das SDS-Polyacrylamidgel im Anschluss an die Proteinauftrennung mit Coomassie-Blau gefärbt wurde der Pierce™ Unstained Protein MW Marker (14.4-116 kDa) der Firma

Thermo Fisher eingesetzt (Abbildung 5, von links nach rechts), der durch die Färbung sichtbar gemacht werden muss.



**Abbildung 5:** In der Arbeit verwendete Protein-Molekulargewichtsmarker. Von links nach rechts: Pierce™ Prestained Protein MW Marker (20-120 kDa), PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (10-250 kDa), PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10-180 kDa), Pierce™ Unstained Protein MW Marker (14.4-116 kDa), alle Marker von Thermo Fisher.

## 4.3 Antikörper

### 4.3.1 Primärantikörper

**Tabelle 2:** Verwendete Primärantikörper

Antigen	Details
$\alpha$ -Tubulin	Monoklonaler Mausantikörper (clone DM1A, Sigma-Aldrich, München), Detektion bei ca. 55 kDa Verdünnung: 1:1000 (Western Blot), in PBS mit 0.1% Tween 20, mit 1% (w/v) Magermilchpulver Inkubation für 1 h bei RT (Raumtemperatur)
CACNA1A ( $\text{Ca}_v2.1\alpha_{1A}$ )	Monoklonaler Kaninchenantikörper (ab181371, Abcam, Cambridge), Detektion bei ca. 282 kDa Verdünnung 1:1000 (Western Blot),

	in TBS mit 0.05% Tween 20, mit 5% (w/v) Magermilchpulver Inkubation über Nacht bei 4°C
CK2 $\alpha$	Monoklonaler Mausantikörper 1A5 [126], Detektion bei ca. 42 kDa Verdünnung 1:500 (Western Blot), in PBS mit 0.1% Tween 20, mit 1% (w/v) Magermilchpulver Inkubation über Nacht bei 4°C
CK2 $\alpha'$	Polyklonales Kaninchenantiserum #30 [127], Detektion bei ca. 38 kDa Verdünnung 1:1000 (Western Blot), in PBS mit 0.1% Tween 20, mit 1% (w/v) Magermilchpulver Inkubation für 3 h bei RT
CK2 $\beta$	Polyklonales Kaninchenantiserum #32 [127], Detektion bei ca. 28 kDa Verdünnung 1:1000 (Western Blot), in PBS mit 0.1% Tween 20, mit 1% (w/v) Magermilchpulver Inkubation für 1 h bei RT
CK2-Phospho-Substratmotiv [(pS/pT)DXE]	Monoklonaler Kaninchenantikörper (#8738, Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main) Detektion von CK2-phosphorylierten Proteinen Verdünnung 1:1000 (Western Blot), in TBS mit 0.05% Tween 20 mit 5% (w/v) BSA Inkubation über Nacht bei 4°C
FLAG	Monoklonaler Mausantikörper (Anti-FLAG M2, Sigma-Aldrich, München) Detektion des FLAG-Tags Verdünnung 1:1000 (Western Blot), in PBS mit 0.1% Tween 20, mit 1% (w/v) Magermilchpulver, Inkubation für 1 h bei RT

HSP70	Polyklonales Kaninchenantiserum (AG von Prof. Dr. Zimmermann, Homburg), Detektion bei ca. 70 kDa Verdünnung 1:500 (Western Blot), in PBS mit 0.1% Tween 20, mit 1% (w/v) Magermilchpulver Inkubation für 1 h bei RT
PARP	Polyklonaler Kaninchenantikörper (#9542, Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main), Detektion bei ca. 89 kDa (cleaved PARP) und 116 kDa (PARP) Verdünnung 1:1000 (Western Blot), in TBS mit 0.05% Tween 20, mit 5% (w/v) Magermilchpulver Inkubation über Nacht bei 4°C

#### 4.3.2 Sekundärantikörper

**Tabelle 3:** Verwendete Sekundärantikörper

Antigen	Details
Kaninchen IgG	Peroxidase-konjugierter Antikörper (aus Ziege, ab205718, Abcam, Cambridge) Verdünnung 1:30000 (CK2 $\alpha'$ , CK2 $\beta$ , PARP, HSP70) bzw. 1:2000 (CK2-Phospho-Substratmotiv, CACNA1A) (Western Blot) Inkubation für 1 h bei RT
Maus IgG	Peroxidase-konjugierter Antikörper (aus Ziege, 115-035146, Dianova, Hamburg) Verdünnung 1:10000 (1A5, $\alpha$ -Tubulin, FLAG) (Western Blot) Inkubation für 1 h bei RT

#### 4.4 Bakterienstämme

Escherichia coli XL1 blue: Der Bakterienstamm besitzt eine Tetracyclinresistenz und wird zur Plasmidamplifikation verwendet.

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15 Tn10* (Tet<sup>r</sup>)]

Quelle: Stratagene, Waldbronn

#### 4.5 Nährmedien für Bakterien

Zur Herstellung des Mediums für die Bakterienanzucht wird 2.5% (w/v) LB-Medium (1% Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 1% NaCl) in H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> gelöst und autoklaviert. Zur Herstellung von Selektionsplatten wird 1.5% Agar-Agar Kobe I hinzugefügt. Die LB-Agar-Lösung wird mit dem entsprechenden sterilen Antibiotikum versetzt und in Petrischalen gegossen. Die Aufbewahrung der Selektionsplatten erfolgt bei 4°C für bis zu zwei Wochen.

#### 4.6 Zellsystem

INS-1 832/13: Ratten-Insulinoma-β-Zelllinie, Glucose-responsiv Passagen ≤45 [128].

Quelle: Prof. Dr. G. Thiel, Homburg

#### 4.7 Primer

**Tabelle 4:** Verwendete Primer

Primer	Sequenz 5' – 3'	Orientierung	Schnittstelle	T <sub>m</sub> [°C]
Klonierprimer Ca <sub>v</sub> 1666-1738 Fw	AGA GAG CTC GAG GGC AAC ATC GGC	5'	<i>Xho</i> 1	70°C



Klonierprimer Ca <sub>v</sub> 1666-1738 Rv	TCT CTC CTC GAG TTA CGC GAA CTC GTT	3'	<i>Xho1</i>	68°C
Mutageneseprimer S1677A Fw	AGA CGA GGA CGC CGA CGA GGA TGA ATT C	5'	-	71°C
Mutageneseprimer S1677A Rv	TCC CCG TCA ATG CCG ATG	3'	-	62°C
Klonierprimer Ca <sub>v</sub> 2177-2369 Fw	AGA GAG GGA TCC GAC CGG GAT CGC	5'	<i>BamHI</i>	71°C
Klonierprimer Ca <sub>v</sub> 2177-2369 Rv	TCT CTC GAA TTC TTA GCA CCA GTC GTC	3'	<i>EcoRI</i>	66°C
Mutageneseprimer S2362G Fw	CGA CGC GTA CGG CGA GAG CGA GGA CG	5'	-	75°C
Mutageneseprimer S2362G Rv	TGCGCGCCCCTGCGGGCT	3'	-	76°C
Mutageneseprimer S2364A Fw	GTA CAG CGA GGC CGA GGA CGA CTG GTG CTA AGA TGG	5'	-	76°C
Mutageneseprimer S2364A Rv	GCG TCG TGC GCG CCC CTG	3'	-	71°C

## 4.8 Plasmide

**Tabelle 5:** Verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenz	Details	Hersteller
p3xFLAG-CMV-7.1	Amp <sup>r</sup>	Eukaryonter Expressionsvektor für FLAG getaggte Fusionsproteine unter der Kontrolle eines CMV-Promotors	Sigma Aldrich
3xFLAG-CMV-CK2 $\alpha$	Amp <sup>r</sup>	cDNA der humanen CK2 $\alpha$ -Untereinheit	Prof. Dr. Claudia Götz
pcDNA6-Ca <sub>v</sub> 2.1	Amp <sup>r</sup>	cDNA des murinen Ca <sub>v</sub> 2.1 $\alpha_{1A}$	Addgene #26578
pGEX-4T-1	Amp <sup>r</sup>	bakterieller Expressionsvektor für GST getaggte Fusionsproteine unter der Kontrolle eines tac-Promotors	Amersham Pharmacia Biotech, München
pGEX-4T-1 Ca <sub>v</sub> 2.1 (1666 – 1719)	Amp <sup>r</sup>	cDNA des murinen Ca <sub>v</sub> 2.1 $\alpha_{1A}$ von AS 1666 – 1719	R. Scheuer
pGEX-4T-1 Ca <sub>v</sub> 2.1 (1666 – 1719) S1677A	Amp <sup>r</sup>	cDNA des murinen Ca <sub>v</sub> 2.1 $\alpha_{1A}$ von AS 1666 – 1719 mit S1677 zu A mutiert	R. Scheuer
pGEX-4T-1 Ca <sub>v</sub> 2.1 (2177 – 2369)	Amp <sup>r</sup>	cDNA des murinen Ca <sub>v</sub> 2.1 $\alpha_{1A}$ von AS 2177 – 2369	Prof. Dr. Claudia Götz
pGEX-4T-1 Ca <sub>v</sub> 2.1 (2177 – 2369) S2362G	Amp <sup>r</sup>	cDNA des murinen Ca <sub>v</sub> 2.1 $\alpha_{1A}$ von AS 2177 – 2369 mit S2362 zu G mutiert	R. Scheuer

pGEX-4T-1 Ca <sub>v</sub> 2.1 (2177 – 2369) S2364A	Amp <sup>r</sup>	cDNA des murinen Ca <sub>v</sub> 2.1 $\alpha_{1A}$ von AS 2177 – 2369 mit S2364 zu A mutiert	R. Scheuer
pGEX-4T-1 Ca <sub>v</sub> 2.1 (2177 – 2369) S2362A/S2364A	Amp <sup>r</sup>	cDNA des murinen Ca <sub>v</sub> 2.1 $\alpha_{1A}$ von AS 2177 – 2369 mit S2362 und S2364 zu A mutiert	R. Scheuer
18AC7OZC_Seq_1_ pMK-RQ	Kana <sup>r</sup>	cDNA des murinen Ca <sub>v</sub> 2.1 $\alpha_{1A}$ von AS 2177 – 2369 mit S2362 und S2364 zu A mutiert	Invitrogen
pRSET-A-CK2 $\alpha$	Amp <sup>r</sup>	cDNA der humanen CK2 $\alpha$ - Untereinheit	Prof. Dr. Claudia Götz
pRSET-A-CK2 $\beta$	Amp <sup>r</sup>	cDNA der humanen CK2 $\beta$ - Untereinheit	Prof. Dr. Claudia Götz

#### 4.9 Gereinigte, rekombinante Proteine

**Tabelle 6:** Verwendete gereinigte, rekombinante Proteine

Name	Details
CK2-Holoenzym	AG Prof. Dr. M. Montenarh
CK2 $\alpha$	AG Prof. Dr. M. Montenarh
GST-Ca <sub>v</sub> 2.1 (1666-1738)	Maus Ca <sub>v</sub> 2.1 (AS 1666-1738), R. Scheuer
GST-Ca <sub>v</sub> 2.1 (1666-1738) S1677A	Maus Ca <sub>v</sub> 2.1 (AS 1666-1738) mit S1677 zu A mutiert, R. Scheuer

GST-Ca <sub>v</sub> 2.1 (2177-2369)	Maus Ca <sub>v</sub> 2.1 (AS 2177-2369), R. Scheuer
GST-Ca <sub>v</sub> 2.1 (2177-2369) S2362G	Maus Ca <sub>v</sub> 2.1 (AS 2177-2369) mit S2362 zu G mutiert, R. Scheuer
GST-Ca <sub>v</sub> 2.1 (2177-2369) S2364A	Maus Ca <sub>v</sub> 2.1 (AS 2177-2369) mit S2364 zu A mutiert, R. Scheuer
GST-Ca <sub>v</sub> 2.1 (2177-2369) S2362A/S2364A	Maus Ca <sub>v</sub> 2.1 (AS 2177-2369) mit S2362 und S2364 zu A mutiert, R. Scheuer

#### 4.10 Puffer und Lösungen

**Tabelle 7:** Puffer für die Agarosegelelektrophorese

DNA-Probenpuffer (6x)	80% 2x TAE-Puffer 20% Glycerol 0.25% (w/v) Bromphenolblau 0.25% (w/v) Xylene cyanol FF Lagerung bei RT
Ethidiumbromid	10 mg/ml gelöst in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> Lagerung bei 4°C
TAE-Puffer (10x), pH 7.4	400 mM Tris-Acetat 200 mM Na-Acetat 10 mM Na <sub>3</sub> -EDTA gelöst in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> , autoklaviert Lagerung bei RT

**Tabelle 8:** Antibiotika und Puffer für die Bakterienkultur

Ampicillin	50 mg/ml 50% (v/v) Ethanol gelöst in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> , sterilfiltriert Lagerung bei -20°C
LB-Agarplatten, pH 7.5	1.5% (w/v) Agar-Agar 1% (w/v) Trypton 1% (w/v) NaCl 0.5% (w/v) Hefeextrakt gelöst in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> , autoklaviert entsprechende Antibiotika zusetzen (50 µg/ml Ampicillin, 12.5 µg/ml Tetracyclin) Lagerung bei 4°C für 14 Tage
LB-Medium, pH 7.5	1% (w/v) Trypton 1% (w/v) NaCl 0.5% (w/v) Hefeextrakt gelöst in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> , autoklaviert Lagerung bei RT
Tetracyclin	6.25 mg/ml gelöst in Ethanol absolut, Lagerung bei -20°C
TfBI (Transformationspuffer für <i>E. coli</i> )	100 mM KCl 50 mM MnCl <sub>2</sub> 30 mM K-Acetat 10 mM CaCl <sub>2</sub> 15% (v/v) Glycerin gelöst in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> , autoklaviert Lagerung bei 4°C
TfBII (Transformationspuffer für <i>E. coli</i> )	10 mM Na-MOPS, pH 7.0 75 mM CaCl <sub>2</sub>

	10 mM KCl 15% (v/v) Glycerin gelöst in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> , autoklaviert
TYM-Medium	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 2 g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O gelöst in 1 l H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> , autoklaviert Lagerung bei RT

**Tabelle 9:** Stocklösungen für den Gebrauch in der Zellkultur

Glucose-Stocklösung	2 M D (+)-Glucose gelöst in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> , sterilfiltriert Lagerung bei 4°C
Natriumpyruvat	1 M Natriumpyruvat gelöst in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> , sterilfiltriert Lagerung bei 4°C
Trypsin/EDTA-Lösung, pH 7.1	0.25% (w/v) Trypsin 0.1% (w/v) EDTA gelöst in PBS, sterilfiltriert Lagerung bei 4°C

**Tabelle 10:** Puffer und Stocklösungen für die zelluläre Proteinextraktion

Complete™ Proteaseinhibitor (25x)	1 Tablette gelöst in 2 ml H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> Lagerung, aliquotiert bei -20°C
-----------------------------------	--

PBS (1x), pH 7.4	137 mM NaCl 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 2.7 mM KCl 1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> gelöst in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> Lagerung bei 4°C
PhosSTOP™ Phosphataseinhibitor (10x)	1 Tablette gelöst in 1 ml H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> Lagerung aliquotiert bei -20°C
Lysepuffer, pH 7.4	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1% (v/v) Triton X-100 1% NP-40 gelöst in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> Lagerung bei -20°C

**Tabelle 11:** Puffer für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

APS	10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat gelöst in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> Lagerung bei -20°C bzw. 4°C
Coomassie-Blau Färbelösung	0.2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 0.01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 50% (v/v) Methanol 10% (v/v) Eisessig ad 100% H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> Lagerung bei RT
Elektrophoresepuffer (10x)	250 mM Tris-HCl, pH 8.8

	1.92 M Glycin 35 mM SDS gelöst in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> Lagerung bei RT
Entfärbelösung für Coomassie-Blau	20% (v/v) Methanol 10% (v/v) Eisessig 70% H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> Lagerung bei RT
Gellösung A, Acrylamid-Stammlösung (gebrauchsfertig)	30% (w/v) Acrylamid 0.8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid Lagerung bei 4°C
Gellösung B, Trenngel	1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 14 mM SDS gelöst in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> Lagerung bei 4°C
Gellösung C, Sammelgel	495 mM Tris-HCl, pH 6.8 14 mM SDS gelöst in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> Lagerung bei 4°C
SDS-Probenpuffer nach Lämmli (3x)	65 mM Tris-HCl, pH 8.8 10% (v/v) Glycerin 5% (v/v) β-Mercaptoethanol 2% (w/v) SDS 0.01% (w/v) Bromphenolblau Lagerung bei 4°C bzw. RT



**Tabelle 12:** Puffer für den Western Blot und die nachfolgende Proteindetektion

Blockpuffer, pH 7.4	5% (w/v) Milchpulver oder 5% (w/v) BSA 0.1% (v/v) oder 0.05% Tween 20 gelöst in PBS oder TBS (Antikörper (AK) abhängig) Lagerung bei 4°C oder -20°C
Inkubationspuffer, pH 7.4	1% bzw. 5% (w/v) Milchpulver oder 5% (w/v) BSA 0.1% (v/v) oder 0.05% Tween 20 gelöst in PBS oder TBS (AK abhängig) Lagerung bei 4°C oder -20°C
PBS (1x)	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.4
TBS (1x)	25 mM Tris-HCl 150 mM NaCl gelöst in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> Lagerung bei 4°C
Transferpuffer (10x)	200 mM Tris-HCl, pH 8.3 1.5 M Glycin gelöst in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> Lagerung bei 4°C
Waschpuffer I, pH 7.4	0.1% (v/v) Tween 20 gelöst in PBS Lagerung bei 4°C
Waschpuffer II, pH 7.4	0.05% (v/v) Tween 20 gelöst in TBS

Lagerung bei 4°C

**Tabelle 13:** Puffer für den *in vitro* CK2-Kinaseaktivitätsassay

CK2-Kinasepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7.5 150 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O 1 mM DTT gelöst in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> Lagerung bei -20°C
CK2 Reaktionsmix, pH 8.5	41.6 mM Tris-HCl 250 mM NaCl 8.4 mM MgCl <sub>2</sub> 2 mM DTT 84 mM ATP gelöst in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> Lagerung, aliquotiert bei -20°C frisch dazu: 0.32 mM synthetisches Peptid für CK2
Synthetisches Peptid für CK2 (Stocklösung)	12 mM synthetisches Peptid für CK2 gelöst in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> Sequenz: RRRDDDSDDD, Lagerung, aliquotiert bei -20°C

**Tabelle 14:** Stocklösungen für CK2 Inhibitoren

CX-4945 Stocklösung	10 mM CX-4945 gelöst in DMSO, Lagerung bei -20°C
---------------------	---

Quinalizarin Stocklösung	10 mM Quinalizarin gelöst in DMSO, Lagerung bei -20°C
--------------------------	--

**Tabelle 15:** Puffer für die Proteinreinigung

Triton X-100	Stock: 20% v/v in PBS
Elutionspuffer I	10 mM Glutathion (red.) 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 Lagerung kurzzeitig bei -20°C
Elutionspuffer II	10 µg/ml Leupeptin 10 mM Glutathion (red.) 100 mM Tris-HCl, pH 8.0
Lysepuffer	1 mM MgCl <sub>2</sub> 5 µg/ml DNase 10 µg/ml RNase 10 µg/ml Leupeptin 10 µg/ PMSF 1% Triton X-100 gelöst in PBS
Waschpuffer III	1% Triton X-100 gelöst in PBS

**Tabelle 16:** Puffer für die Insulin- und Calciummessung

Krebs-Ringerlösung Bicarbonat-HEPES Puffer (KRBH)	135 mM NaCl 3.6 mM KCl
--	---------------------------

	5 mM NaHCO <sub>3</sub> 0.5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.5 mM MgCl <sub>2</sub> 1.5 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM HEPES pH 7.4 0.1% BSA
Krebs-Ringerlösung Bicarbonat Puffer (KRB)	115 mM NaCl 4.7 mM KCl 1.28 mM CaCl <sub>2</sub> 1.2 mM MgSO <sub>4</sub> pH 7.0 0.1% BSA

#### 4.11 Computerprogramme

**Tabelle 17: Verwendete Computerprogramme und Websites**

Typ	Name	Quelle
Programm zur Detektion und Quantifizierung von Nucleinsäuren und Proteinen	Bio-Rad Quantity One® 1-D Analysis Software 4.6.5	Bio-Rad, München
DNA- und Protein Informationen	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> <a href="http://uniprot.org/">http://uniprot.org/</a> <a href="https://prosite.expasy.org/">https://prosite.expasy.org/</a>	National Center for Biotechnology Information Uniprot ExPASy Bioinformatics Resource Portal
Primerdesign	<a href="https://www.bioinformatics.org/sms2/">https://www.bioinformatics.org/sms2/</a> <a href="https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/">https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/</a>	Sequence Manipulation Suite EMBOSS Needle Thermo

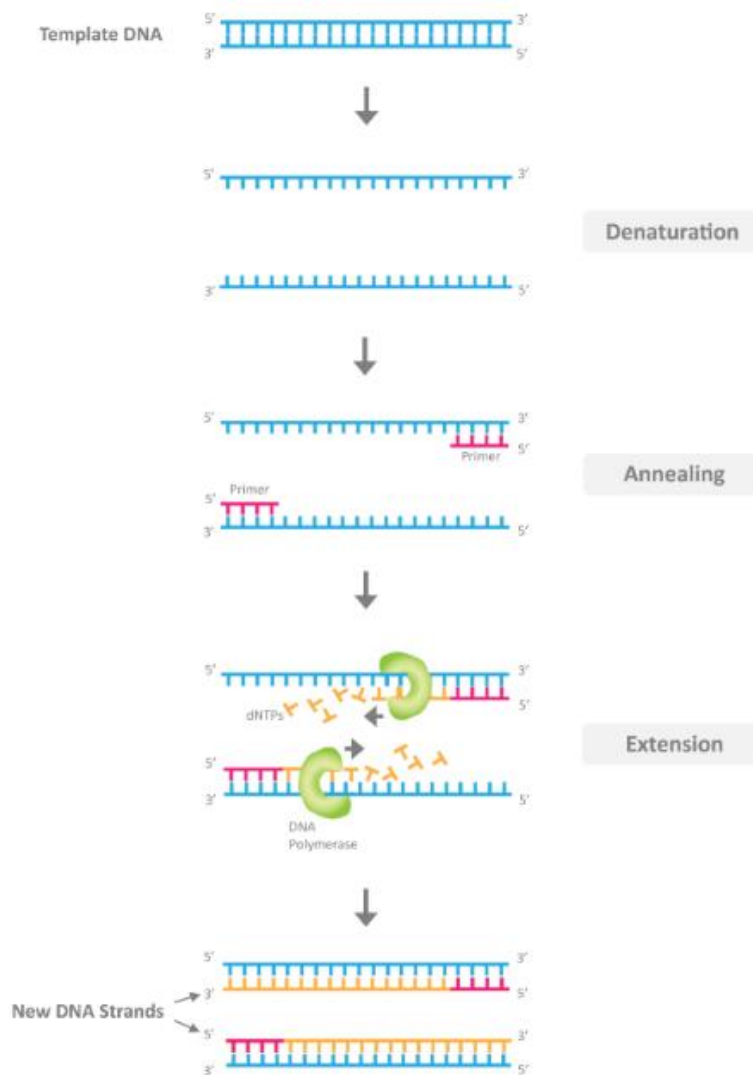
	T <sub>m</sub> Calculator <a href="http://nebasechanger.neb.com/">http://nebasechanger.neb.com/</a>	Fisher Scientific, Waltham New England Biolabs, Frankfurt/Main
Statistische Auswertung und Erstellung der Balkendiagramme	Microsoft Office Excel	Microsoft
Bibliographieprogramm	Mendeley Reference Management Software 1.19.3	Mendeley
Software für die Calciummessung und -auswertung	TILLvisION	TILL Photonics, Kaufbeuren

## 5. Methoden

### 5.1 Molekularbiologische Methoden

#### 5.1.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro* Methode zur Amplifikation doppelsträngiger DNA-Sequenzen [129]. Zunächst werden dabei zwei Oligonukleotid-Primer gewählt, die gegenläufig an komplementäre DNA-Sequenzen binden und die gewünschte Sequenz somit einschließen. Weiterhin wird eine thermostabile DNA-Polymerase, Desoxyribonukleotide (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP), und in PCR-Puffer gelöste  $Mg^{2+}$ -Ionen benötigt. Die enzymatisch-katalysierte, temperaturgesteuerte Kettenreaktion verläuft in drei Schritten, die sich in 20-40 Zyklen wiederholen. Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung. Dabei wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 98°C in Einzelstränge aufgetrennt. Dadurch können sich die Primer beim anschließenden Annealing-Schritt an Ihre entsprechende komplementäre Sequenz anlagern. Die Temperatur wird dazu auf 50-65°C gesenkt, je nach verwendeten Primern (2-3°C unter dem Schmelzpunkt). Schließlich erfolgt der Elongationsschritt bei 72°C. Ausgehend von den Primern wird der neue DNA-Strang komplementär zum Matrizen-Strang durch die thermostabile DNA-Polymerase verlängert (Abbildung 6). Dauer und Temperatur der einzelnen Schritte sind abhängig von der DNA-Probe und der Schmelztemperatur des Primers und sind daher für jede PCR variabel. In der vorliegenden Arbeit wurde die Phusion™ HF DNA-Polymerase zur Amplifikation der PCR-Fragmente verwendet. Diese setzt sich aus einer *Pyrococcus*-ähnlichen Polymerase und einer eingefügten dsDNA-bindenden Proteindomäne zusammen (<https://www.neb-online.de/pcr-dna-amplifikation/high-fidelity-pcr/phusionhigh-fidelity-dna-polymerase/>, 12.08.2019) und zeichnet sich durch eine hohe Genauigkeit und Geschwindigkeit aus. Mit jedem Zyklus steigen die neu synthetisierten DNA-Sequenzen exponentiell an. Im Anschluss an die PCR kann das amplifizierte PCR-Fragment mittels Agarosegelelektrophorese überprüft bzw. reisoliert werden. Die Tabelle 18 und 19 zeigen die Komponenten und das Programm für eine Standard PCR-Reaktion.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)** ([www.goldbio.com/goldbios-pcr-overview#PCR](http://www.goldbio.com/goldbios-pcr-overview#PCR)). Dargestellt ist ein PCR-Zyklus mit der Denaturierung der Doppelstränge, der Anlagerung (Annealing) der Primer und der Elongation durch eine DNA-Polymerase.

**Tabelle 18:** Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes der Phusion HF DNA Polymerase

Komponenten	50 µl Reaktionsvolumen	Endkonzentration
Nuklease-freies Wasser	ad 50 µl	/
Phusion® GC oder HF 5x Reaction Buffer	10 µl	1x
10 mM dNTPs	1 µl	200 µM
10 µM 3' Primer	1 µl	0.2 µM
10 µM 5' Primer	1 µl	0.2 µM
DNA	variabel	< 1 µg
Phusion Polymerase (2 U/µl)	0.5 µl	1 Unit

**Tabelle 19:** Standard PCR-Bedingungen

Reihenfolge	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	98°C	30 s
2. Denaturierung	98°C	10 s
3. Annealing	T <sub>m</sub> Primer (°C)	20 s
4. Elongation	72°C	15 s
5. Finale Elongation	72°C	5 min

Schritt 2. -4. wird in 30 Zyklen wiederholt.

### 5.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Trennung geladener Moleküle im elektrischen Feld und stellt eine Methode zur Auftrennung von DNA-Molekülen dar [130]. Das Phosphatrückgrat der DNA ist negativ geladen, weswegen die DNA-Moleküle im elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Laufgeschwindigkeit der Moleküle wird durch die Porengröße des Agarosegels bestimmt. Kleinere DNA-Fragmente wandern schneller durch die Poren als große Fragmente. Je nach Größe der Fragmente werden 1-2%-ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung der Gele wird die Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.571% Eisessig) gekocht und gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wird Ethidiumbromid (0.5 µg/ml) zur Anfärbung der DNA-Fragmente hinzugefügt. Direkt im Anschluss wird die Lösung unter dem



Abzug in eine vorbereitete Gelkammer gefüllt, damit sie polymerisieren kann. Die DNA-Proben werden mit DNA-Probenpuffer (80% 2 x TAE-Puffer, 20% Glycerol, 0.25% (w/v) Bromphenolblau, 0.25% (w/v) Xylene cyanol FF) versetzt, in die Taschen des Gels geladen und bei einer konstanten Spannung von 80-100 V in TAE-Laufpuffer aufgetrennt. Der Ladepuffer erhöht die Dichte der Proben und zeigt die zurückgelegte Laufstrecke an. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid zwischen den Basenpaaren der doppelsträngigen DNA-Moleküle werden die Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgt durch den Vergleich der Banden eines mitgeführten DNA-Molekulargewichtsmarkers mit den Probenbanden.

### 5.1.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Reisolation und Reinigung der PCR-Fragmente aus dem Agarosegel erfolgt mittels des GeneJET Gel Extraction Kit der Firma Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben. Das Prinzip der Reinigung beruht auf der reversiblen Adsorption der DNA an eine Säulenmatrix. Die gewünschte DNA-Bande wird dazu aus dem Agarosegel ausgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt und in Bindepuffer bei 56°C aufgelöst. Anschließend wird die Probe auf eine Säule gegeben und bei 13000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und die Säule mit 700 µl Waschpuffer gewaschen. Der Zentrifugationsschritt wird wiederholt und der Durchfluss abermals verworfen. Durch eine erneute Zentrifugation wird die Säule von dem restlichen Waschpuffer befreit. Die Säule wird danach in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß gestellt und die DNA mit 50 µl H<sub>2</sub>O eluiert. Nach der erneuten Zentrifugation wird die Säule entsorgt und die DNA bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

### 5.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt über die Messung der optischen Dichte (OD) durch ein Spektrometer. Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich aus der OD bei 260 nm (Absorptionsmaximum Pyrimidine und Purine), dem Verdünnungsfaktor und einem für DNA bzw. RNA spezifischen Multiplikationsfaktor. Zur Bestimmung der Reinheit der Lösung zu treffen erfolgt eine Messung bei 280 nm (Detektion von Proteinen). Der Quotient  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  sollte bei ausreichender Reinheit der DNA bei 1.8 – 2.0 liegen und bei RNA bei 1.9. Zur Berechnung der Konzentration wird folgende Formel verwendet:

$$c_{ssDNA} \text{ [ng/}\mu\text{l]} = OD_{260nm} \times 33 \text{ [ng/}\mu\text{l]} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$C_{\text{dsDNA}} [\text{ng}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260\text{nm}} \times 50 [\text{ng}/\mu\text{l}] \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$C_{\text{RNA}} [\text{ng}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260\text{nm}} \times 40 [\text{ng}/\mu\text{l}] \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

### 5.1.5 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die doppelsträngige DNA an einer für sie spezifischen Sequenz aus vier bis acht Basenpaaren schneiden können. Dabei entstehen abhängig von der Endonuklease gerade Enden (blunt ends) oder versetzte Enden (sticky ends). Die Restriktionsendonukleasen finden unter anderem Anwendung bei der Klonierung und dienen zum Einbringen eines Gens in die Multiple Cloning Site des Plasmids. Durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Schnittstellen am 5' und 3' Ende des DNA-Fragmentes kann das Gen sofort in der richtigen Orientierung eingefügt werden. Der anschließende Verdau wird mit den für die Enzyme empfohlenen Pufferbedingungen durchgeführt. Dabei werden 5 µg des Vektorplasmids bzw. der komplette PCR-Ansatz mit je 2-3 U der Restriktionsenzyme pro 1 µg DNA für zwei bis drei Stunden oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Enzyme für 20 Minuten bei 80°C inaktiviert. Die Kontrolle und Aufreinigung der geschnittenen DNA erfolgt mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese. In der vorliegenden Arbeit wird zur Klonierung von Ca<sub>v</sub>2.1 (1666 - 1738) in den Vektor pGEX-4T-1 das Restriktionsenzym *XhoI* verwendet. Für die Klonierung von Ca<sub>v</sub>2.1 (2177 – 2369) in den Vektor pGEX-4T-1 wurden die beiden Restriktionsenzyme *BamHI* und *EcoRI* verwendet.

### 5.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation der DNA-Fragmente mit dem Vektor im Anschluss an einen Restriktionsverdau erfolgt mit Hilfe des Enzyms T4 DNA-Ligase. Sie katalysiert, mit ATP als Cofaktor, die Bildung einer Esterbindung freier 3' Hydroxylgruppen und freier 5' Phosphatgruppen der doppelsträngigen DNA-Moleküle. In der Tabelle 20 ist ein Standard-Ligationsansatz beschrieben:

**Tabelle 20:** Zusammensetzung eines Standard Ligationsansatzes.

Komponente	20 µl Reaktionsvolumen
10x T4-Ligasepuffer	2 µl
Vektor	25 ng
Insert	25-100 ng
T4-DNA-Ligase (2 U/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub>	ad 20 µl

Die Ligation erfolgt über eine Stunde bei 22°C oder über Nacht bei 8°C mit anschließender Inaktivierung der Ligase für zehn Minuten bei 65°C. Die Hälfte des Ligationsansatzes wird zur Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien eingesetzt. Zur Kontrolle der Selbstligationsrate des Vektors wird ein Kontrollansatz, der lediglich den geschnittenen Vektor enthält, mitgeführt.

### 5.1.7 DNA-Mutagenese

Die in dieser Arbeit beschriebenen Phosphorylierungsmutanten von Ca<sub>v</sub>2.1 wurden mit Hilfe des Q5® site-directed mutagenesis Kits von NEB hergestellt. Die Methode erlaubt die spezifische Mutation eines DNA-Abschnittes in Doppelstrang-Plasmiden. Zunächst werden dafür Primer mit Hilfe des NEBase Changer Tools (<http://nebasechanger.neb.com/>) generiert. Anschließend wird die DNA in einer PCR-Reaktion (Tabelle 21 und 22) amplifiziert.

**Tabelle 21:** Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes Q5® site-directed mutagenesis Kits

Komponenten	25 µl Reaktionsvolumen	Endkonzentration
Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	12.5 µl	1x
DNA	variabel	1-25 ng
10 µM 3' Primer	1.25 µl	0.5 µM
10 µM 5' Primer	1.25 µl	0.5 µM
Nuklease-freies Wasser	ad 25 µl	-

**Tabelle 22:** Standard PCR-Bedingungen für die Q5® site-directed Mutagenese

Reihenfolge	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	98°C	30 s
2. Denaturierung	98°C	10 s
3. Annealing	50-72°C	10-30 s
4. Elongation	72°C	20-30 s/kb
5. Finale Elongation	72°C	2 min

Die Schritte 2.-4. wird 25-mal wiederholt. Im Anschluss an die PCR erfolgt eine Ligase, Kinase und *DpnI* Behandlung (Tabelle 23) für fünf Minuten bei Raumtemperatur.

**Tabelle 23:** Standard PCR-Bedingungen für die Q5® site-directed Mutagenese

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
PCR-Produkt	1 µl	-
2x KLD Reaktionspuffer	5 µl	1x
10x KLD Enzym-Mix	1 µl	1x
Nuklease-freies Wasser	3 µl	-

Von der KLD-Reaktion werden 5 µl für die Transformation von 50 µl kompetenten Bakterien eingesetzt. Der Transformationsansatz wird auf Selektionsplatten ausplattiert und die Plasmid-DNA aus den entstandenen Klonen isoliert. Das hergestellte Plasmid wird dann mittels Sequenzierung überprüft.

### 5.1.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung, der in dieser Arbeit hergestellten Plasmide, erfolgte durch die Firma Eurofins Genomics.

### 5.1.9 Erzeugung chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien

Die transformationskompetenten *E. coli* (XL1 blue) Bakterien wurden nach der Methode von Hanahan [131] hergestellt. Dazu werden 50 µl der Bakterien zu 20 ml TYM-Medium gegeben und unter Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag werden 4.5 ml dieser Kultur mit 450 ml TYM-Medium unter Schütteln bei 37°C inkubiert bis eine OD<sub>600nm</sub> von 0.4 - 0.6 erreicht ist. Die Bakterienkultur wird dann für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für zehn Minuten bei 4000xg und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 100 ml eiskaltem TfbI-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 4000xg, 4°C). Das erhaltene Bakterienpellet wird dann in 20 ml eiskaltem TfbII-Puffer gelöst und die kompetenten Bakterien aliquotiert. Die Bakterien werden unverzüglich in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.

### 5.1.10 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Die Transformation ist die Aufnahme freier DNA durch Bakterienzellen und dient der Überprüfung einer Ligation bzw. der Vermehrung von Plasmid-DNA. Dazu werden 60 µl kompetente *E. coli* XL1 blue Bakterien mit 200-500 ng Plasmid-DNA oder 2-10 µl des Ligationsansatz gemischt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock bei 42°C für zwei Minuten und eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Dem Ansatz werden 300 µl vorgewärmtes LB-Medium zugefügt und die Proben für eine Stunde bei 37°C und 700 rpm geschüttelt. Nach der Inkubation werden die Bakterien pelletiert und der Überstand bis auf einen Rest von 100 µl abgenommen. In den restlichen 100 µl werden die Bakterien resuspendiert und anschließend auf Selektionsplatten (mit Antibiotikum) ausplattiert bzw. direkt in LB-Medium (mit Antibiotikum) gegeben. Die Selektionsplatten mit den Klonen können bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden. Die Flüssigkultur kann zur Überprüfung der Expression oder für die Plasmidisolierung verwendet werden.

### 5.1.11 Herstellung von Agar-Selektionsplatten

Zur Herstellung von Selektionsplatten werden 400 ml LB-Medium mit 6 g Agar-Agar gemischt und die Lösung autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wird die jeweilige sterile Antibiotikumlösung (50 µg/ml Ampicillin, 12.5 µg/ml Tetracyclin) hinzugefügt und die Lösung in Petrischalen gefüllt. Die Aufbewahrung der Selektionsplatten erfolgt bei 4°C für bis zu zwei Wochen.

### 5.1.12 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Isolation größerer Mengen an Plasmid-DNA aus Bakterien werden 200 ml LB-Medium (mit Antibiotikum) mit einem Klon oder einem Teil des Transformationsansatzes angeimpft. Die Flüssigkultur wird über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag werden die Bakterien für 15 Minuten bei 4°C und 6000xg abzentrifugiert und die Plasmid-DNA mit Hilfe des NucleoBond® Plasmid DNA Purification Kits der Firma Macherey-Nagel isoliert. Dazu wird das Pellet in 4 ml S1 Puffer resuspendiert und anschließend werden 4 ml S2 Puffer dazu gegeben. Die Lösung wird sechsmal vorsichtig invertiert und fünf Minuten bei Raumtemperatur zur Lyse inkubiert. Durch eine Zugabe von 4 ml S3 Puffer und erneutem Invertieren flockt die genomische DNA aus. Die Suspension wird danach für fünf Minuten auf Eis inkubiert und schließlich über eine Nucleobond-Säule filtriert, um sie von genomischer DNA und Zelltrümmern zu befreien. Die Säule wurde zuvor mit 2.5 ml N2 Puffer äquilibriert. Nach der Filtration erfolgt ein zweimaliges Waschen der Säule mit je 10 ml N3 Puffer und im Anschluss wird die Plasmid-DNA mit 5 ml N5 Puffer in ein silanisiertes Corex Röhrchen eluiert. Die Fällung der DNA geschieht durch Zugabe von 3.5 ml Isopropanol und anschließender Zentrifugation für 30 Minuten bei 4°C und 16000xg. Nach vorsichtiger Abnahme des Überstandes wird die gefällte DNA in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> aufgenommen.

### 5.1.13 Induktion der Proteinexpression in *E. coli* Bakterien

*E. coli* Bakterien werden verwendet, um große Proteinmengen zu produzieren. Dazu werden die Bakterien mit einem bakteriellen Expressionsplasmid, welches das Gen - codierend für das Protein von Interesse - enthält, transformiert. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente werden *E. coli* XL1 blue Bakterien mit dem pGEX-4T-1 Vektor, in den zuvor die zu untersuchenden Sequenzen kloniert wurden, transformiert. Dieser enthält ein regulierbares Promotor/Operator-Element, welches sich aus einem *tac*-Promotor und einem *lac*-Operator zusammensetzt. Hinter diesem Element liegt die Sequenz für die Glutathion-S-Transferase (26 kDa). Dadurch können GST-Fusionsproteine gebildet werden. Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) wird als ein künstlicher Induktor des *lac*-Operons verwendet. IPTG bindet an der *lac*-Repressor und führt zu dessen Konformationsänderung, wodurch die Inhibition des *lac*-Operons aufgehoben wird und die Transkription stattfindet. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Konditionen zur Induktion der Proteinexpression beschrieben. Die zuvor transformierten *E. coli* XL1 blue Bakterien werden in LB-Medium mit Antibiotika (Ampicilin 1:1000, Tetracyclin 1:500) und Glucose (2%) über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wird die Bakterienkultur 1:10 mit LB-Medium (mit Antibiotika und Glucose) verdünnt und erneut bei 37°C unter Schütteln

inkubiert bis eine  $OD_{600nm}$  von 0.5 – 0.6 erreicht wurde. Anschließend erfolgt die Induktion der Expression durch die Zugabe von IPTG (1 mM). Als Negativkontrolle dient dabei eine Bakterienkultur, bei der die Expression nicht induziert wurde. Zur Expression der Proteine werden die Bakterien für weitere zwei Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wird je 1 ml der Proben zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proteine werden bei 95°C für fünf Minuten denaturiert, auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteinexpression mittels Coomassie-Blau Färbung überprüft.

#### 5.1.14 Reinigung von rekombinanten GST-Fusionsproteinen

Durch Affinitätschromatographie mittels Glutathion (GSH)-Sephargose können GST-getaggte Proteine nach der Proteinexpression in Bakterien gereinigt werden. Im Folgenden wird das Protokoll für die Reinigung von GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (1666-1738) (Wildtyp und Mutante) erläutert. Dazu werden *E. coli* XL1 blue Bakterien wie zuvor beschrieben transformiert und die Proteinexpression induziert. Anschließend wird die Bakterienkultur für 10 min bei 7700xg und 4°C abzentrifugiert und das Bakterienpellet in PBS (50 µl/ml Kultur; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) resuspendiert. Im Anschluss erfolgt der Aufschluss auf Eis mit Hilfe von Ultraschall (50%, Stufe 5. pulsierend) für dreimal 30 Sekunden mit je 30 Sekunden Pause dazwischen. Zur Suspension wird Triton X-100 (1%) gegeben und die Probe für 30 Minuten unter Rollen bei 4°C inkubiert. Während dieser Zeit wird die GSH-Sephargose (600 µl) dreimal mit PBS gewaschen. Nach der 30-minütigen Inkubation wird die Suspension für zehn Minuten bei 12000xg und 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und die GSH-Sephargose hinzugefügt. Danach wird die Probe über Nacht unter Rollen bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wird die Suspension für fünf Minuten bei 10xg und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Sephargose mehrmals mit PBS gewaschen. Nach dem Waschen wird das Protein mit 300 µl Elutionspuffer I (10 mM Glutathion (red.), 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) über Nacht bei 4°C unter Rollen eluiert und der Elutionsschritt am nächsten Tag zweimal für eine Stunde wiederholt. Für die Reinigung von GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369) (Wildtyp und Mutanten) wurde das folgende Protokoll durchgeführt. Das Bakterienpellet wird in Lysepuffer (1.5 ml/ 50 ml Bakterienkultur; 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 µg/ml DNase, 10 µg/ml RNase, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml PMSF, 1% Triton X-100 in PBS) resuspendiert und für dreimal 30 Sekunden mit je 30 Sekunden Pause dazwischen sonifiziert. Die Suspension wird für zehn Minuten bei 14000xg und 4°C zentrifugiert. Im Anschluss erfolgt die Bindung an zuvor mit PBS gewaschene GSH-Sephargose für zwei Stunden bei 4°C unter Rollen. Danach wird die Sephargose mehrmals mit PBS gewaschen. Die Proteinreinigung wird

mit Hilfe von SDS-PAGE und Coomassie-Blau Färbung überprüft und Aliquots der gereinigten Proteine bei -20°C oder -80°C gelagert.

## **5.2 Zellkulturtechniken**

### **5.2.1 Kultivieren der Zellen**

Die Kultivierung der verwendeten adhärenenten pankreatischen  $\beta$ -Zelllinie INS-1 832/13 findet in 100 mm Zellkulturschalen statt. Die Zellen werden bei einer konstanten Temperatur von 37°C, sowie 95% relativer Luftfeuchtigkeit (rH) und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% gehalten. Als Nährmedium wird das RPMI 1640 Medium (Roswell Park Memorial Institute medium) der Firma Life Technologies (11 mM Glucose) mit 10% FCS, 1 mM Natriumpyruvat und 50  $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol verwendet. Da die Glucoseresponsivität der Zellen mit der Zeit verloren geht wurden für Experimente eine Passagenzahl von <45 benutzt. Zur Vermeidung von mikrobiellen Kontaminationen werden die Zellkulturarbeiten unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### **5.2.2 Passagieren der Zellen**

Zum Passagieren der INS-1 832/13 Zellen wird zunächst das Medium abgesaugt. Danach wird 1 ml Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben und diese für kurze Zeit bei Raumtemperatur inkubiert. EDTA (Ca<sup>2+</sup>-Chelator) komplexiert die für die Zell-Zell-Bindung wichtigen Ca<sup>2+</sup>-Ionen und die Protease Trypsin spaltet die Proteinverbindungen zwischen den Zellen und zum Gefäßboden, was zu einem Ablösen der Zellen führt. Nach der Inkubation wird die Trypsin/EDTA Lösung wieder abgesaugt und durch leichtes Klopfen der Schale werden die Zellen endgültig gelöst. Anschließend wird die Zellsuspension in frischem RPMI 1640 Medium aufgenommen, durch vorsichtiges Resuspendieren gemischt und in neue Zellkulturschalen gegeben. Die INS-1 832/13 Zellen werden dabei in Verdünnungen von 1:3 bis 1:10 ausgesät.

### **5.2.3 Einfrieren der Zellen**

Durch das Einfrieren von Säugerzellen in flüssigem Stickstoff können diese über einen längeren Zeitraum gelagert werden. Dazu wird im Vorfeld Einfriermedium angesetzt



(70% Medium, 10% DMSO, 20% FCS) und die Zellen abtrypsinieren. Anschließend wird die Zellsuspension für sieben Minuten bei 253xg und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Zellpellet vorsichtig in 1.5 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und in ein kaltes Kryoröhrchen überführt. Diese werden über Nacht bei -80°C in einem CoolCell®-Gefrierbehälter gelagert. Der Metallring im Inneren des Gefäßes sorgt dabei für ein schonendes, gleichmäßiges Herunterkühlen der Zellen um 1°C pro Minute. Am nächsten Tag werden die Zellen in einen Kryotank überführt, wo sie bis zu Ihrem Gebrauch bei -196°C über längere Zeit gelagert werden können.

#### **5.2.4 Auftauen der Zellen**

Das Auftauen der gefrorenen Zellen erfolgt möglichst schnell in einem 37°C warmen Wasserbad. Die Zellen werden anschließend in ein steriles 50 ml Röhrchen überführt. Danach wird langsam und tropfenweise 10 ml kaltes Kulturmedium ohne Zusätze hinzugefügt, sodass das im Einfriermedium enthaltene DMSO stufenweise verdünnt wird. Die Zellsuspension wird für sieben Minuten bei 253xg und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 6 ml Kulturmedium mit Zusätzen resuspendiert und in eine 100 mm Zellkulturschale überführt. Am nächsten Tag wird ein Medienwechsel zur Entfernung von toten Zellen und Zelltrümmern durchgeführt.

#### **5.2.5 Behandlung der Zellen mit CK2-Inhibitoren**

Die INS-1 832/13 Zellen werden einen Tag vor der Behandlung ausgesät, sodass die Konfluenz am Behandlungstag 60-70% entspricht. Die CK2-Hemmstoffe CX-4945 (Stock: 10 mM in DMSO) und Quinalizarin (Stock: 10 mM in DMSO) werden in der gewünschten Konzentration (CX-4945: 10 µM, Quinalizarin: 50 µM) in Kulturmedium gelöst. Das Medium der zu behandelten Zellen wird abgesaugt und durch das Kulturmedium mit dem CK2-Inhibitor ersetzt. Als Negativkontrolle werden bei allen Experimenten Zellen mit einer äquivalenten Menge an DMSO behandelt.

### 5.2.6 Behandlung der Zellen mit Cycloheximid

Cycloheximid (CHX) kann die Proteinsynthese in eukaryotischen Zellen hemmen und wird in der Molekularbiologie verwendet, um Halbwertszeiten von Proteinen zu bestimmen. Zur Stabilitätsbestimmung von Ca<sub>v</sub>2.1 werden die INS-1 832/13 Zellen einen Tag zuvor ausgesät, sodass die Konfluenz etwa 60-70% betrug. Am Folgetag wird das Medium abgenommen und durch Kulturmedium mit Cycloheximid (100 µg/ml) ersetzt. In einem parallelen Ansatz werden Zellen gleichzeitig mit dem CK2-Inhibitor CX-4945 (10 µM) zur Überprüfung des Einflusses einer CK2-Phosphorylierung auf die Stabilität des Ca<sub>v</sub>2.1 behandelt. Anschließend werden die Zellen für verschiedene Zeiträume kultiviert.

### 5.2.7 Behandlung der Zellen mit MG132

MG132 ist ein Proteasom-Inhibitor, der die Degradation von Ubiquitin-konjugierten Proteinen reduziert. Zur Überprüfung des Abbaus von Ca<sub>v</sub>2.1 werden die INS-1 832/13 Zellen einen Tag zuvor ausgesät, sodass die Konfluenz etwa 60-70% beträgt. Das Medium wird abgenommen und durch Kulturmedium mit MG132 (5 µM) ersetzt. Auch hier wird in einem parallelen Ansatz gleichzeitig die CK2 mit CX-4945 gehemmt, um den Einfluss einer CK2-Phosphorylierung auf den Abbau des Proteins zu untersuchen. Die Zellen werden für unterschiedliche Zeiträume kultiviert.

### 5.2.8 Ernten der Zellen

Zum Ernten der Zellen wird das Medium abgenommen, PBS (137 mM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) auf die Zellen gegeben und diese mit Hilfe eines Zellschabers von der Zellkulturschale abgelöst. Anschließend werden die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt und für sieben Minuten bei 4°C und 253xg zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wird entweder sofort für weitere Analysen verwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 5.2.9 Transiente Transfektion von Zellen

Die Transfektion bezeichnet das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Dies geschieht unter anderem durch spezielle Expressionsvektoren. Dabei passiert die DNA die Zellmembran, ihre Information wird in mRNA transkribiert und die im Vektor codierten Gene werden exprimiert. Man unterscheidet zwischen der transienten Transfektion, bei der das Einbringen der DNA nur vorübergehend stattfindet, und der stabilen Transfektion, bei der die Fremd-DNA in die genomische DNA integriert wird. In der vorliegenden Arbeit wurden die Experimente mit dem Transfektionsreagenz TurboFect durchgeführt. Am Vortag werden die Zellen so ausgesät, dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 70-90% besitzen. Für die Transfektion wird die Plasmid-DNA in Medium ohne Zusätze verdünnt und anschließend mit TurboFect gemischt. Die Lösung wird 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend tropfenweise in das Zellmedium gegeben und die Zellen für 48 Stunden inkubiert. Tabelle 24 gibt einen Überblick über die Zusammensetzung der Transfektionsansätze.

**Tabelle 24:** Transfektionsansätze

Zellkulturgefäß	Reagenz [µl]	DNA [µg]	Kulturmedium ohne Zusätze [ml]	Kultivierungsmedium [ml]
6-well Platte	6	4	2	0.4
60 mm Schale	12	6	3	0.6

## 5.3 Proteinchemische und immunologische Arbeitsmethoden

### 5.3.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten zur Proteinanalyse

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten werden die INS-1 832/13 Zellen, wie zuvor beschrieben geerntet und das Zellpellet in doppeltem bis dreifachem Volumen Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100) mit einem Protease- (1:25) und einem Phosphatase-Inhibitor Cocktail (1:10) resuspendiert. Da es sich in dieser Arbeit um Membranproteine handelt wird dem Lysepuffer zusätzlich Nonidet P-40 (1%) zugefügt. Das Detergenz denaturiert die Proteine nicht, sondern sorgt dafür, dass die Proteine in ihrer natürlichen Konformation aus der Membran gelöst werden. Die Suspension wird für 20

Minuten auf Eis inkubiert und anschließend dreimal 30 Sekunden (mit je 30 s Pause) in einem eiskalten Ultraschallbad bei 35 kHz vollständig aufgeschlossen. Im Anschluss wurden die Proben für 30 Minuten bei 16100xg und 4°C zentrifugiert. Die pelletierten Zelltrümmer werden verworfen und der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgt eine Proteinbestimmung nach Bradford. Die Zellextrakte werden kurzfristig bei -20°C und längerfristig bei -80°C gelagert.

### **5.3.2 Quantifizierung von Proteinen nach Bradford**

Die Proteinbestimmung nach Bradford basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliant blau G250 von 465 nm zu 595 nm nach Komplexbildung mit Proteinen in einem sauren Milieu. Der Farbstoff bindet an kationische/unpolare Aminosäuren und wird dadurch in seiner anionischen Form stabilisiert. Die Verschiebung kann photometrisch gemessen werden, wobei die Intensität der Absorption direkt proportional zur Proteinkonzentration ist. Für die Bestimmung des Proteingehaltes wird der Proteinassay-Kit der Firma BioRad verwendet. Dazu werden 800 µl H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> mit 200 µl Bradfordreagenz in einer Halbmikroküvette gemischt und 1 µl des zu bestimmenden Zellextraktes hinzugefügt. Nach kurzem Vortexen und einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Extinktion bei 595 nm gegen einen Leerwert mit H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> gemessen. Die Proteinquantifizierung erfolgt durch eine Doppelbestimmung. Der Proteingehalt kann an Hand einer BSA-Eichkurve berechnet werden.

### **5.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese handelt es sich um eine elektrophoretische Methode zur Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe [132]. Das anionische Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) das im Probenpuffer enthalten ist, überdeckt die Eigenladung der Proteine und verleiht ihnen durch Mizellenbildung eine negative Nettoladung. Der Probenpuffer enthält außerdem β-Mercaptoethanol zur Reduktion der Disulfidbrücken und durch eine Denaturierung bei 95°C für fünf Minuten werden die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufgelöst und es kommt zur Entfaltung der Proteinkette. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die negativ geladenen Proteine zur Anode. Dabei wandern kleinere Proteine schneller durch die Poren der Gelmatrix als große Proteine. Die Polyacrylamidgele werden durch radikalische Polymerisation von Acrylamid und die Quervernetzung durch N,N'-Methylenbisacrylamid hergestellt. Als Starter der Reaktion dient Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) fungiert als Katalysator.

Die Porengröße der Gelmatrix wird durch die Konzentration an Acrylamid und Bisacrylamid bestimmt und richtet sich nach der Größe der zu untersuchenden Proteine. Vor der Benutzung der Gießapparatur werden alle Bestandteile sorgfältig mit Ethanol gereinigt. Zum Gießen der Gele wird die Kammer zusammengebaut, zunächst zu ca. 75% mit Trenngel gefüllt und dieses mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wird das Isopropanol entfernt, das Sammelgel in die Kammer gefüllt und zur Bildung von Geldaschen Kämme in das Sammelgel gesteckt. Nach dem Aushärten des Sammelgels können die Gele feucht und kühl bei 4°C gelagert werden. Sammel- und Trenngel unterscheiden sich durch Porengröße, Ionenstärke und ihren pH-Wert. Als Elektrolyt wird ein Tris-Glycin-Puffer eingesetzt. Durch den pH-Gradienten zwischen den Gelen ergibt sich ein Stapelungseffekt, da das Glycin durch den höheren pH-Wert seine positive Ladung verliert und die Proteine beim Wandern überholt. Zur Herstellung der Gele wurde eine gebrauchsfertige Acrylamid-Stammlösung (Lösung A: 30% (w/v) Acrylamid, 0.8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid), für das Trenngel die Pufferlösung B (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 14 mM SDS) und für das Sammelgel die Pufferlösung C (495 mM Tris-HCl, pH 6.8, 14 mM SDS) verwendet. Die Zusammensetzung der Gele ist in der Tabelle 25 dargestellt.

**Tabelle 25:** Zusammensetzung der Trenngele und des Sammelgels

<b>Trenngel (%)</b>	<b>7.5</b>	<b>10</b>	<b>12.5</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>Sammelgel (%)</b>	<b>4.3</b>
<b>Lösung A (ml)</b>	9	12	15	18	24	<b>Lösung A (ml)</b>	2.2
<b>Lösung B (ml)</b>	9	9	9	9	9	<b>Lösung C (ml)</b>	3.8
<b>Wasser (ml)</b>	18	15	12	9	3	<b>Wasser (ml)</b>	9
<b>APS (µl)</b>	200	200	200	200	200	<b>APS (µl)</b>	100
<b>TEMED (µl)</b>	20	20	20	20	20	<b>TEMED (µl)</b>	10

Zur Durchführung der SDS-PAGE wird die Konzentration der Proteine mittels Bradford-Assay bestimmt, gleiche Proteinmengen mit SDS-Probenpuffer (65 mM Tris-HCl, pH 8.8, 10% (v/v) Glycerin, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS, 0.01% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und die Proben für 5 min bei 95°C denaturiert. Das SDS-Polyacrylamidgel wird in eine Elektrophoresekammer eingespannt und diese mit Elektrophoresepuffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1.92 M Glycin, 35 mM SDS) befüllt. Anschließend werden die vorbereiteten Proben, sowie ein Proteingrößenstandard in die Taschen des Gels pipettiert und die Proteine bei 35 mA aufgetrennt.

### 5.3.4 Proteinfärbung mit Coomassie-Blau

Im Anschluss an eine SDS-PAGE können die aufgetrennten Proteine durch eine Färbung mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht werden. Die Gele werden dazu für 20 Minuten in der Coomassie-Blau-Färbelösung (0.2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 0.01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, 50% Methanol, 10% Essigsäure) unter Schütteln fixiert und anschließend in einer Entfärbelösung (10% Eisessig, 20% Methanol, 70% H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub>) unter Schütteln inkubiert bis die Proteinbanden deutlich sichtbar werden.

### 5.3.5 Western Blot Analyse

Die durch eine SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können in einem Tank-Blot-System, mit angelegter elektrischer Spannung, auf eine Trägermembran (z.B.: PVDF) übertragen werden (Western Blot). Der Aufbau der Blotapparatur für den Proteintransfer verläuft nach folgendem Schema:

Kathode  
 Schwamm  
 3 Blatt Whatman Papier  
 SDS-Polyacrylamidgel  
 PVDF-Membran  
 3 Blatt Whatman Papier  
 Schwamm  
 Anode

Die Schwämme und die Whatman Papiere werden mit Transferpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM Glycin) angefeuchtet und die PVDF-Membran in Methanol aktiviert. Der Transfer findet entweder bei 350 mA für zwei Stunden oder bei 100 mA über Nacht statt. Durch das Anlegen des elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel in Richtung Anode und werden so auf die PVDF-Membran transferiert und immobilisiert.

### 5.3.6 Immunologischer Proteinnachweis

Zum Nachweis der auf die PVDF-Membran transferierten Proteine können spezifische Antikörper verwendet werden. Dazu werden zunächst die unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln in einem Blockpuffer

blockiert. Anschließend wird die Membran mit dem Primärantikörper unter Schütteln behandelt. Die Inkubationszeit und -temperatur sowie die Verdünnung sind dabei von dem verwendeten Antikörper abhängig. Zur Entfernung von nicht gebundenem Primärantikörper wird die Membran dreimal für je fünf Minuten mit einem Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss erfolgt eine einstündige Inkubation mit einem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur und unter Schütteln. Die Auswahl und Verdünnung des Sekundärantikörpers ist dabei abhängig von dem verwendeten Primärantikörper. Nach erneutem Waschen der Membran in Waschpuffer (3x, 5 min) wird der Blot entwickelt. Der Sekundärantikörper ist mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Dieses katalysiert die Oxidation von Luminol mit Hilfe von Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) wodurch ein Chemilumineszenz-Signal entsteht, das detektiert werden kann. Zum Nachweis wird das SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate oder das SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Für die Detektion der Chemilumineszenz und die Quantifizierung der Proteinbanden wird die Software Quantity One 4.6.5 (Bio-Rad) benutzt. Die Membran wird nach der Detektion getrocknet und zwischen Filterpapieren bei 4°C aufbewahrt.

### 5.3.7 Coimmunpräzipitation

Mit der Immunpräzipitation können Proteine mit Hilfe eines Antikörpers aus einem Zellextrakt isoliert werden. Es ist ebenfalls möglich unter physiologischen Pufferbedingungen an das zu isolierende Protein gebundene Proteine zu präzipitieren (Coimmunpräzipitation). Die präzipitierten Proteine werden durch SDS-PAGE und anschließenden Western Blot mit Immundetektion identifiziert. Die  $F_c$ -Domäne des Antikörpers bindet dabei reversibel an Protein-G-Sepharose. Die einzelnen Schritte der Immunpräzipitation werden bei 4°C durchgeführt und die verwendeten Puffer und Lösungen werden ebenfalls auf 4°C vorgekühlt. INS-1 832/13 Zellen werden vor der Immunpräzipitation für zwei Stunden in Glucose-freiem RPMI Medium 1640 bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$ /95% rH gehungert. Anschließend wird das Medium zu Glucose-freiem RPMI Medium oder RPMI Medium mit 10 mM Glucose gewechselt und die Zellen für weitere drei Stunden bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$ /95% rH inkubiert. Die Zellen werden geerntet, aufgeschlossen und eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Für jede Präzipitation werden 60 µl eines 50%-Sepharosegemischs aus Protein-G-Sepharose und CL-4B-Sepharose eingesetzt (1:2) und zuvor dreimal mit PBS (pH 7.4) gewaschen. Die CL-4B-Sepharose dient dabei lediglich der Volumenvergrößerung. Es werden zwei Vorpräzipitationsschritte mit dem Sepharosegemisch und dem Zellextrakt (5 mg) für je eine Stunde bei 4°C unter Rollen durchgeführt, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen.

und als Kontrolle der Bindung des zu isolierenden Proteins an den Antikörper. Während dieser Zeit werden 10 µl des Ca<sub>v</sub>2.1 Antikörpers (abcam ab181371) mit einem weiteren Sepharosegemisch bei 4°C unter Rollen inkubiert. Im Anschluss wird der Überstand des Vorpräzipitats zu der Antikörper-gekoppelten Sepharose gegeben und über Nacht bei 4°C unter Rollen inkubiert. Am nächsten Tag wird das Vorpräzipitat und das Immunpräzipitat dreimal mit PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) gewaschen, mit 50 µl SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95°C für fünf Minuten denaturiert und die Proteine auf einem SDS-Polyacrylamidgel getrennt. Folgende Kontrollen werden mitgeführt: ein Aliquot des Überstandes nach Präzipitation, ein Aliquot des Zellextraktes, ein Aliquot der Sepharose, sowie 3 µl des Antikörpers mit dem präzipitiert wurde. Danach werden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und die copräzipitierten Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen Ca<sub>v</sub>2.1 (abcam ab181371) und CK2α (1A5) nachgewiesen.

### 5.3.8 *In vitro* CK2-Kinaseaktivitätsassay

Die CK2-Kinaseaktivität kann *in vitro* im Zellextrakt über den Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat (<sup>32</sup>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) in ein synthetisches Substratpeptid (RRRDDSDDDD) bestimmt werden. Das Serin der Sequenz kann dabei durch die CK2 phosphoryliert werden [133]. Dazu werden 10 µg Gesamtzellextrakt in 20 µl CK2-Kinasepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) aufgenommen. Nach Zugabe von 30 µl des radioaktiven CK2-Reaktionsmixes (41.6 mM Tris-HCl, pH 8.5, 250 mM NaCl, 8.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 84 µM ATP, 0.32 mM synthetisches Peptid, 10 µCi [<sup>32</sup>P]-γ-ATP/0.5 ml) werden die Proben für fünf Minuten bei 37°C inkubiert und zum Abstoppen der Reaktion für fünf Minuten auf Eis gelagert. Anschließend werden 40 µl der Probe auf ein Whatman P81 Ionenaustausch-Filterpapier pipettiert, das das Peptidsubstrat bindet. Das Filterpapier wird dreimal mit 85 mM Phosphorsäure und einmal mit Ethanol für je fünf Minuten gewaschen, um überschüssiges Phosphat zu entfernen. Nach dem Waschen wird das Filterpapier unter Rotlicht getrocknet und danach in Szintillationsröhrchen überführt. Im Szintillationszähler wird die von der Probe abgegebene Čerenkov-Strahlung gemessen und somit die CK2-Aktivität bestimmt. Zur Erfassung der Hintergrundstrahlung wird eine Probe mit dem CK2-Kinasepuffer ohne Protein mitgeführt. Diese wird später von dem cpm-Messwerten abgezogen. Für jede Probe wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Messung der CK2-Aktivität wurde von Prof. Dr. Claudia Götz ausgeführt.



### 5.3.9 Apoptosenachweis durch Spaltung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)

Der proteolytische Abbau der Poly-ADP-Ribosepolymerase (PARP) durch eine Caspase ist ein Zwischenschritt bei der Apoptose [134]. Die Spaltprodukte von PARP (89 kDa und 24 kDa) können daher als Marker für die Apoptose dienen. Der Nachweis wird mit einem spezifischen Antikörper gegen PARP durchgeführt.

### 5.3.10 Bestimmung von Phosphorylierungsstellen mit Peptidfiltern

Zur Eingrenzung von putativen CK2-Phosphorylierungsstellen können neben der *in vitro* Phosphorylierung von rekombinanten Proteinen auch Peptidfilter verwendet werden. Dazu werden die möglichen Stellen für eine CK2-Phosphorylierung als Peptide (15 Aminosäuren) auf eine Zellulosemembran gespottet. Dies wurde durch die AG von Prof. Dr. Jung in Homburg durchgeführt. Der Filter wird für fünf Minuten in Ethanol bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend über Nacht in CK2-Kinasepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) mit 1% BSA überführt. Am nächsten Tag wird der Filter in Kinasepuffer ohne BSA dreimal für fünf Minuten gewaschen. Die Phosphorylierung erfolgt in 1 ml CK2-Kinasepuffer mit 4 µg CK2-Holoenzym bzw. 16 µg CK2 $\alpha$ -Enzym und 10 µCi [<sup>32</sup>P]- $\gamma$ -ATP für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln. Im Anschluss wird der Filter dreimal in CK2-Kinasepuffer mit 1 M NaCl gewaschen. Als Negativkontrolle dient ein Filter ohne CK2-Holoenzym bzw. CK2 $\alpha$ -Enzym. Die Detektion der Radioaktivität erfolgt mittels Autoradiographie.

### 5.3.11 *In vitro* Phosphorylierung

Durch die *in vitro* Phosphorylierung von rekombinanten Proteinen können diese als Substrate einer Proteinkinase identifiziert werden. Dies kann sowohl unter nicht radioaktiven Bedingungen als auch unter radioaktiven Bedingungen ablaufen. Dazu werden gleiche Mengen von GST-Fusionsproteinen mit 0.8 µg CK2-Holoenzym bzw. 4 µg CK2 $\alpha$ -Enzym gemischt und mit Kinasepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. In einem parallelen Experiment wird den Ansätzen 1 µl ATP (20 mM) oder 2-3 µCi [<sup>32</sup>P]- $\gamma$ -ATP zugefügt. Im Anschluss werden die Ansätze für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 10 µl SDS-Probenpuffer (65 mM Tris-HCl, pH 8.8, 10% (v/v) Glycerin, 5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol,

2% (w/v) SDS, 0.01% (w/v) Bromphenolblau) gestoppt, die Proteine für fünf Minuten bei 95°C denaturiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im Fall eines nicht radioaktiven Phosphorylierungsassays wird anschließend eine Western Blot Analyse durchgeführt und die Phosphorylierung der Proteine mit Hilfe eines CK2-Phospho-Substratmotiv-Antikörpers [(pS/pT)DXE] (#8738, Cell Signaling Technology) untersucht. Bei einem radioaktiven Phosphorylierungsassay wird das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt, getrocknet und autoradiographisch analysiert. Bei der *in vitro* Phosphorylierung von Gesamtzellextrakten werden INS-1 832/13 Zellen mit CX-4945 (10 µM) oder mit DMSO als Kontrolle behandelt, geerntet und aufgeschlossen. Nach einer Proteinbestimmung nach Bradford werden 80 µg Gesamtzellextrakt für das radioaktive Phosphorylierungsassay mit 2-3 µCi [<sup>32</sup>P]-α-GTP eingesetzt.

### 5.3.12 *In vitro* GST pull-down Assay

Ein *in vitro* GST pull-down Assay dient dem Nachweis der physikalischen Interaktion zwischen Proteinen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen dem Ca<sub>v</sub>2.1 Protein und den CK2-Untereinheiten CK2α und CK2β untersucht. Dazu werden zunächst GST-Fusionsproteine an GSH-Sepharose immobilisiert. Des Weiteren werden nach dem Protokoll des TnT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems die CK2α und die CK2β *in vitro* translatiert und dabei mit [<sup>35</sup>S]-Methionin radioaktiv markiert. Die GST-Fusionsproteine werden mit 15 µl des *in vitro* Translationsansatzes gemischt und mit PBST (137 mM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4, 0.1% Tween 20) auf 200 µl aufgefüllt. Die Proben werden über Nacht bei 4°C unter Rollen inkubiert. Am nächsten Tag werden die Ansätze dreimal mit PBST und einmal mit PBS (137 mM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) gewaschen, mit 30 µl Probenpuffer versetzt und für fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Im Anschluss werden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel wie in Abschnitt 5.3.4 beschrieben mit Coomassie-Blau gefärbt, fixiert und in einer Entfärbelösung inkubiert. Anschließend wird das Gel für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit einer Verstärkerlösung (1 M Natriumsalicylat) behandelt, getrocknet und autoradiographisch untersucht. Zur weiteren Verstärkung des radioaktiven Signals werden die getrockneten Gele mit dem aufgelegten Autoradiographiefilm bei -80°C gelagert. Kommt es zu einer Bindung der CK2-Untereinheiten an die GST-Fusionsproteine so kann ein Signal detektiert werden.

### 5.3.13 Autoradiographie

Radioaktiv markierte Proteine werden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend für zweieinhalb Stunden bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Das getrocknete Gel wird durch Auflegen eines Röntgenfilmes für unterschiedliche Zeiträume exponiert und der Film anschließend entwickelt und die entstandenen Banden analysiert.

### 5.3.14 Peptid-Kompetitionsassay

Der Peptid-Kompetitionsassay dient der Bestätigung einer spezifischen Antigen-Antikörper Bindung. Dazu werden Zellextrakte auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die Proteine aufgetrennt. Anschließend erfolgt ein Western Blot und die Immundetektion. Vor der Immundetektion wird der Ca<sub>v</sub>2.1 Antikörper (ab181371, Abcam) mit einem Peptid (ab205923, Abcam), das dem Epitop entspricht, welches durch den Antikörper erkannt wird, neutralisiert (1:20). Der Antikörper ist damit an das Peptid gebunden und nicht mehr in der Lage an das Epitop des Proteins zu binden. Als Positivkontrolle wird der unbehandelte Antikörper verwendet. Beide Antikörperlösungen werden für 30 Minuten bei 4°C unter Rollen inkubiert. Anschließend wird die Immundetektion wie zuvor beschrieben durchgeführt.

### 5.3.15 „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)

Die Detektion des Insulingehaltes im Medienüberstand von INS-1 832/13 Zellen und von murinen pankreatischen Inseln erfolgt mit dem Rat Insulin ELISA Kit von Thermo Fisher. Die Inseln wurden uns dabei freundlicherweise vom Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie in Homburg zur Verfügung gestellt. Die Detektion des Insulingehaltes im Medienüberstand der INS-1 832/13 Zellen wurde nach dem Protokoll von Merglen et al. [135] durchgeführt. Die Zellen werden einen Tag zuvor in 6-well Zellkulturschalen ausgesät, sodass die Konfluenz am Tag des Experimentes ca. 60-70% beträgt. Am nächsten Tag werden die Zellen für zwei Stunden in Glucose-freiem RPMI Medium 1640 bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>/95% rH gehungert. Anschließend wird das Medium durch einen Glucose-freien Krebs-Ringer Bicarbonat-HEPES Puffer (KRBH-Puffer: 135 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, pH 7.4) ausgetauscht und für weitere 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>/95% rH inkubiert, sodass die Zellen sich an das Puffersystem gewöhnen können. BSA (0.1%) wird als ein Insulin „carrier“ hinzugefügt. Nach der Inkubation werden die Zellen mit Glucose-freiem KRBH-Puffer gewaschen und über 30 Minuten in einem

KRBH-Puffer mit 10 mM Glucose und CX-4945 (10  $\mu$ M) bzw. die gleiche Menge an DMSO als Kontrolle inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wird der Medienüberstand der Zellen abgenommen und 1:4 bzw. 1:10 mit Assay Diluent C verdünnt. Da die murinen pankreatischen Inseln eine andere Glucoseresponsivität als die INS-1 832/13 Zellen besitzen, wurde die Detektion des Insulingehaltes im Medienüberstand von pankreatischen Inseln nach dem Protokoll von Kelly et al. [136] durchgeführt. Dazu werden die Inseln über Nacht in Glucose-freiem RPMI Medium 1640 inkubiert und am nächsten Tag in einem Krebs-Ringer Puffer (115 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.28 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , pH 7.4, 0.1% BSA) mit 1.1 mM Glucose für 40 Minuten bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$ /95% rH inkubiert. Gleichzeitig werden die Zellen mit CX-4945 (10  $\mu$ M) bzw. der gleichen Menge an DMSO als Kontrolle behandelt. Der Puffer wird gegen einen KRB-Puffer mit 5.6 mM Glucose mit CX-4945 (10  $\mu$ M) bzw. der gleichen Menge an DMSO ausgetauscht. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$ /95% rH wird der Medienüberstand abgenommen und mit Assay Diluent C verdünnt. Neben den Proben wird ein entsprechender Insulinstandard, der in dem Kit vorhanden ist, mitgeführt. 100  $\mu$ l der verdünnten Proben und des Standards werden jeweils als Doppelbestimmung in die Kavitäten der Platte pipettiert und für zweieinhalb Stunden bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiter-Platten-Schüttler inkubiert (450 rpm). Die Lösung wird verworfen und nach viermaligem Waschen mit Waschpuffer wird zu jeder Kavität 100  $\mu$ l biotinylierter Antikörper hinzugefügt und erneut eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiter-Platten-Schüttler inkubiert (450 rpm). Die Lösung wird ebenfalls verworfen und die Kavitäten erneut viermal mit Waschpuffer gewaschen. Danach wird zu jeder Kavität 100  $\mu$ l einer Streptavidin-HRP Lösung hinzugefügt und für weitere 45 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiter-Platten-Schüttler inkubiert (450 rpm). Nach der Inkubation wird die Lösung erneut verworfen und der Waschschrift wiederholt. Danach werden 100  $\mu$ l Substratlösung in jede Kavität gegeben, die Proben abgedunkelt und für weitere 30 Minuten auf einem Mikrotiter-Platten-Schüttler inkubiert (450 rpm). Danach wird die Reaktion durch Zugabe einer Stopplösung abgebrochen. Anschließend wird die Absorption im Infinite M200 Pro TECAN Reader bei 450 nm und 550 nm gemessen. Zur optischen Korrektur wird der 550 nm Wert von dem 450 nm Wert subtrahiert. Im Anschluss wird die Insulinkonzentration der Proben im Vergleich zu den Insulinstandards ermittelt.

### 5.3.16 Messung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration

Die Detektion der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration von INS-1 832/13 Zellen erfolgt mit Hilfe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikators Fura 2-AM. Fura 2 ist ein Fluoreszenzfarbstoff der Chelatkomplexe mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bildet. Durch die Bindung an Acetoxymethylester (AM) kann er die Membran

passieren. Innerhalb der Zelle wird AM dann durch endogene Esterasen abgespalten, Fura 2 dadurch aktiviert und ein Austreten des Fluoreszenzfarbstoffs verhindert. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten Fluoreszenzänderung wird bei 340 nm ( $\text{Ca}^{2+}$ -Fura 2-Komplex) und 380 nm (freies Fura 2) gemessen. Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration wird durch das Verhältnis der Fluoreszenz bei 340/380 nm ermittelt. Die INS-1 832/13 Zellen werden einen Tag vor dem Experiment auf Deckgläschen ausplattiert, sodass die Konfluenz am nächsten Tag ca. 60-70% beträgt. Die Zellen werden dann wie auch für die Messung des Insulingehaltes für zwei Stunden in Glucose-freiem RPMI Medium 1640 bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$ /95% rH gehungert. Anschließend werden die Zellen mit 5  $\mu\text{M}$  Fura-2 -Acetoxy-Methylester gelöst in Glucose-freiem KRBH-Puffer (135 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 5 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0.5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM HEPES, pH 7.4) im Dunkeln beladen und für 30 Minuten bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$ /95% rH inkubiert. Danach werden die Zellen mit Glucose-freiem KRBH-Puffer gewaschen und die Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration wird in einer offenen Kammer mit 300  $\mu\text{l}$  Glucose-freiem KRBH-Puffer gestartet. Die Beladung der Zellen und die Messung fand bei Raumtemperatur statt. Nach fünf Minuten werden 300  $\mu\text{l}$  KRBH-Puffer mit 20 mM Glucose und CX-4945 (20  $\mu\text{M}$ ) bzw. die gleiche Menge an DMSO manuell zu der Lösung in der Kammer hinzugefügt, sodass die Endkonzentration für Glucose 10 mM und für CX-4945 10  $\mu\text{M}$  beträgt. Die Messung wird mittels eines inversen Mikroskops (Axiovert S100, Zeiss) ausgestattet mit einem Monochromator (Polychrome V, TILL-Photonics) durchgeführt. Alle zwei Sekunden wird Fura-2 abwechselnd bei 340 nm und 380 nm für 20 Millisekunden angeregt und die emittierte Fluoreszenz (F340 and F380, >510 nm) wird mit einer charge-coupled device (CCD) Kamera (TILL Imago, TILL-Photonics) aufgenommen. Einzelne Zellen werden als Region von Interesse markiert und ein Zell-freier Bereich für die Hintergrund-Korrektur gewählt. Die Messung und die Analyse wird mit Hilfe der TILLvision software (TILL-Photonics) durchgeführt. Zur Durchführung des „readdition“-Experiments wird die Messung in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem KRBH-Puffer gestartet, nach 5 min wird Glucose (Endkonz.: 10 mM) und CX-4945 (Endkonz.: 10  $\mu\text{M}$ ) bzw. die gleiche Menge an DMSO zugefügt und nach 15 Minuten wird eine  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (Endkonz.: 1.5 mM) dazu gegeben.

### 5.3.17 RNA-Interferenz

Bei der RNA-Interferenz interagieren kurze RNA-Stücke mit der mRNA. Unter Beteiligung von Enzymkomplexen wird die mRNA gespalten und die Translation verhindert. Dadurch kann ein „knockdown“ eines Gens erzielt werden. INS-1 832/13 Zellen werden einen Tag vor dem Experiment in 6-well Kulturschalen ausgesät, sodass die Konfluenz 60-70% beträgt. Die

Experimente werden mit einem gegen  $\text{Ca}_v2.1$  gerichteten siRNA pool (Dharmacon L-090177-02-0005) und als Kontrolle mit einem scramble siRNA pool (Dharmacon D-001810-10-05) durchgeführt. Bei Messungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration wird gleichzeitig ein Indikator für die Transfektionseffizienz (siGLO Green Transfection Indicator, Dharmacon D-001630-01-05) (1:1) transfiziert. Für die Transfektion wird die siRNA (200 nM) in Medium ohne Zusätze (Gesamtvolumen 200  $\mu\text{l}$ ) zusammen mit dem Transfektionsindikator (1:1) verdünnt. Parallel dazu wird das Transfektionsreagenz DharmaFECT 1 von Dharmacon (10  $\mu\text{l}$ ) in einem zweiten Eppendorfgefäß mit Medium ohne Zusätze (Gesamtvolumen 200  $\mu\text{l}$ ) verdünnt. Die Ansätze werden für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden sie zusammengefügt und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wird danach tropfenweise in das Zellmedium gegeben, die Zellen für 48 Stunden inkubiert und im Anschluss geerntet oder für ein Calciumexperiment verwendet.

Die Abschnitte Materialien und Methoden wurden mit Hilfe des Methodenbuchs der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Montenarh der Medizinischen Biochemie und Molekularbiologie der Universität des Saarlandes und mit in der Arbeitsgruppe angefertigten Arbeiten erstellt [137–140].

## 6. Ergebnisse

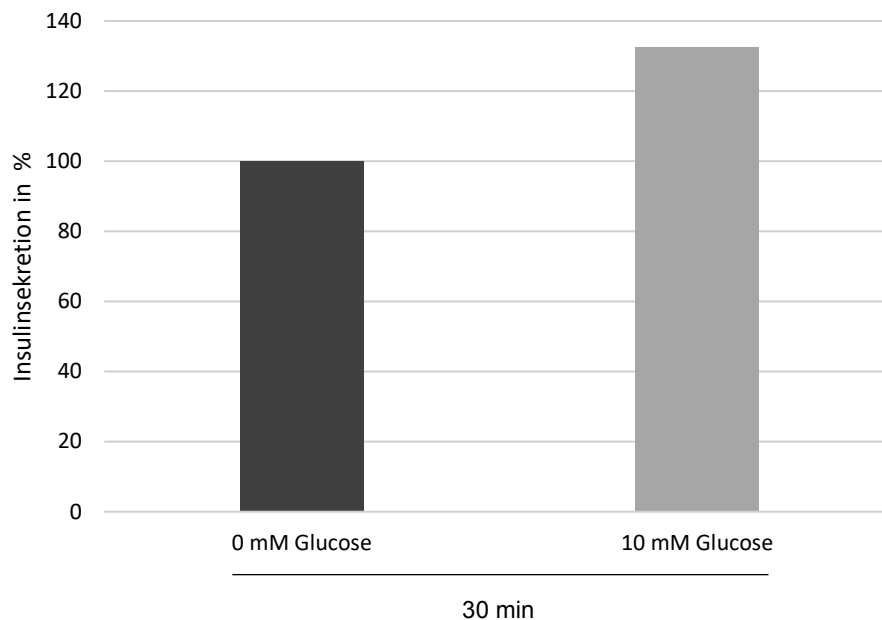
In bisherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe Montenarh wurden molekulare Mechanismen in pankreatischen  $\beta$ -Zelllinien identifiziert, in welchen die Proteinkinase CK2 Auswirkungen auf die Glucose-stimulierte Insulinregulation hat [138, 140, 141]. Die Proteinkinase CK2 phosphoryliert Proteine und kann damit deren Aktivität aktivieren oder inhibieren. Die Beobachtungen weisen darauf hin, dass die CK2 einen negativen regulatorischen Effekt auf den Insulinsignalweg ausübt. In der hier vorliegenden Dissertation wurde die Bedeutung der CK2 für die Glucose-stimulierte Insulinsekretion (GSIS) in pankreatischen  $\beta$ -Zellen (INS-1 832/13) untersucht. Signal für den Transport von Insulinvesikeln zur Membran ist ein Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration. Deshalb wurden auch mögliche Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration untersucht. Der spannungsabhängige Calciumkanal  $\text{Ca}_v2.1$  wurde dabei als mögliches Zielmolekül für die CK2 näher untersucht.

### 6.1 Untersuchungen der INS-1 832/13 Zelllinie als Zellkulturmodell zur Analyse der Glucose-stimulierten Insulinsekretion

Zur Analyse der Auswirkung einer CK2-Phosphorylierung auf die GSIS wurde die INS-1 832/13 Zelllinie in der vorliegenden Arbeit verwendet. Dabei handelt es sich um einen Subklon der INS-1 Zelllinie (Insulinoma1-Zelllinie), welche mit einem Plasmid transfiziert wurde, das das humane Proinsulin Gen enthält [128]. INS-1 Zellen sind endokrine Zellen der Langerhans-Inseln eines Ratten-Pankreas. Aufgrund einer Behandlung mit Röntgenstrahlen entwickelten diese ein Insulinom (gutartiger neuroendokriner Tumor) mit einer Überproduktion an Insulin [142]. Stimuliert man die Zellen mit Glucose setzen sie vermehrt in Vesikeln gespeichertes Insulin frei. Die GSIS der INS-1 832/13 ist um ein fünffaches geringer als in primären pankreatischen Ratteninseln. Die parentale INS-1 Zelllinie weist hingegen eine um das 11-fache geringere Insulinsekretion auf [128].

Zur Untersuchung der Glucoseresponsivität der INS-1 832/13 Zellen wurden diese zunächst über Nacht in Glucose-freiem Medium inkubiert. Am nächsten Tag sollten die Glucosereserven der Zellen soweit erschöpft sein, dass sie somit auf einen Glucosestimulus hin Insulin freisetzen. Dazu wurden die Zellen über 30 Minuten in Medium mit 0 mM Glucose oder 10 mM Glucose gehalten. Das freigesetzte Insulin in den Medienüberständen wurde mittels eines spezifischen „Enzyme-linked Immunosorbent Assays“ (ELISA-Test) nachgewiesen. Dabei war nach einem Glucose-Stimulus (10 mM) die Insulinkonzentration in den Medienüberständen

um das 1.3-fache erhöht (Abbildung 7). Dies zeigte, dass die INS-1 832/13 Glucose-responsiv sind und die Zelllinie für weitere Experimente zur Untersuchung der GSIS geeignet ist.

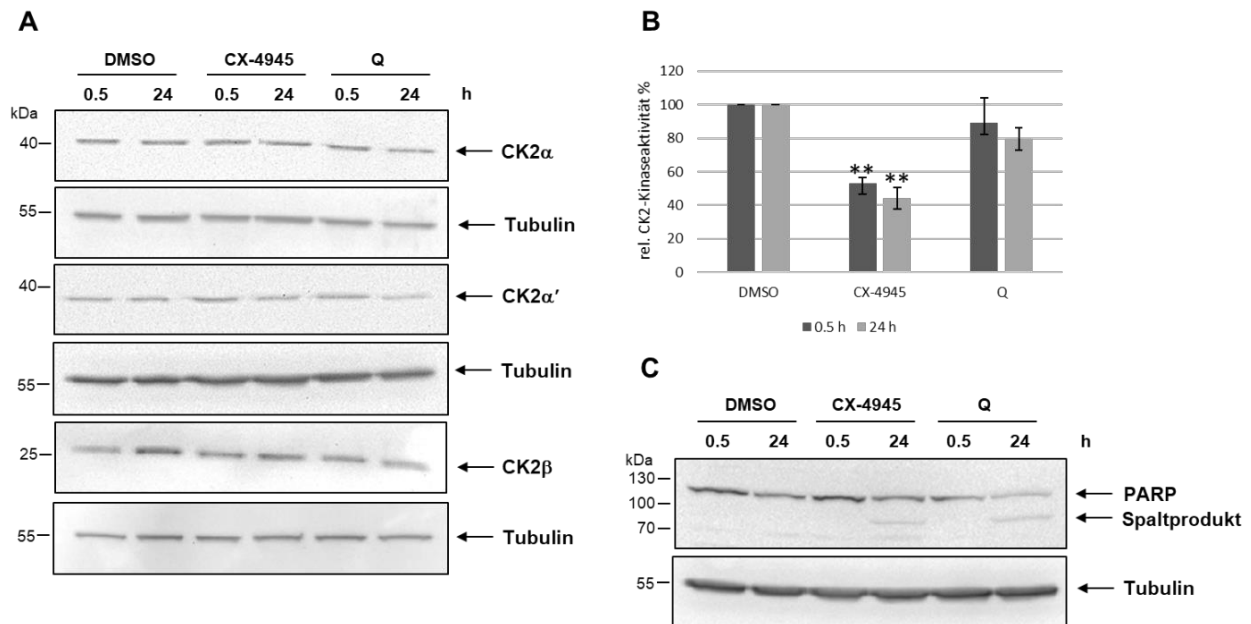


**Abbildung 7: Insulinsekretion in Medienüberständen von INS-1 832/13 Zellen nach einer Stimulation mit 10 mM Glucose über 30 min.** INS-1 832/13 Zellen wurden über Nacht bei 0 mM Glucose gehalten und am nächsten Tag für 30 min mit 0 mM Glucose oder 10 mM Glucose weiter inkubiert. Die Insulinsekretion des Medienüberstandes wurde mittels eines ELISA-Kits ermittelt. Daten sind dargestellt als Mittelwert aus Doppelwerten eines Experimentes.

Nachdem die Funktionalität der Zellen bestätigt werden konnte, wurde anschließend untersucht, welchen Effekt eine CK2-Hemmung in INS-1 832/13 Zellen auf die Menge der CK2-Untereinheiten, die CK2-Aktivität und die Zellviabilität hat. Zur Hemmung der CK2-Kinaseaktivität wurden ATP-kompetitive Inhibitoren, welche die Kinasefunktion der CK2 in der Zelle einschränken, verwendet. Quinalizarin (Q) und Silmitasertib (CX-4945) sind als spezifische Inhibitoren der CK2 beschrieben [143, 144], und wurden in der vorliegenden Arbeit zur Hemmung der CK2 eingesetzt. Inhibitoren sollten zunächst in jeder Zelllinie getestet werden, da sich die Zelllinien unter anderem hinsichtlich der Aufnahme von Stoffen (z.B. Inhibitoren) oder des intrazellulären Transports unterscheiden können. Zur Analyse der Auswirkungen einer Inhibition der Proteinkinase CK2 mit diesen Hemmstoffen in den INS-1 832/13 Zellen wurde deshalb zunächst die Kinaseaktivität der CK2 mittels eines spezifischen CK2-*in vitro*-Kinaseassays gemessen. Aufgrund vorheriger CK2-Inhibitionsexperimenten der



Arbeitsgruppe Montenarh in pankreatischen Zelllinien wurden die Konzentrationen der CK2-Hemmstoffe wie folgt gewählt: 50  $\mu$ M Quinalizarin und CX-4945 10  $\mu$ M CX-4945. Die INS-1 832/13 Zellen wurden dabei jeweils für 30 Minuten und 24 Stunden mit den jeweiligen Inhibitoren behandelt. Bei einer Inhibition mit CX-4945 ist die Aktivität der Kinase nach 30 Minuten um ca. 45% signifikant herabgesetzt, bei einer Behandlung mit Quinalizarin um ca. 10%. Nach 24 Stunden ist die Aktivität bei beiden Hemmstoffen um weitere ~10% verringert (Abbildung 8 B). Um zu zeigen, dass die veränderte Kinaseaktivität nicht durch eine verringerte Proteinexpression bedingt ist, wurden die Untereinheiten der CK2 ( $\alpha$ ,  $\alpha'$  und  $\beta$ ) auf Proteinebene mittels Western Blot untersucht. In Abbildung 8 A ist zu sehen, dass die Proteinexpressionen von CK2 $\alpha$ , CK2 $\alpha'$  und CK2 $\beta$  durch die Inhibition mit Quinalizarin und CX-4945 nicht beeinflusst werden. Die verringerte Kinaseaktivität ist somit nicht die Folge einer verminderten Proteinexpression der CK2. Die CK2 ist in vielen Tumorzellen überexprimiert und schützt die Zellen vor Apoptose. Durch eine Hemmung kommt es deshalb in vielen Tumorzellen zur Apoptose [93, 110, 145, 146]. Folglich wurde die Zellviabilität nach CK2-Inhibition untersucht, indem die Zellen auf eine Spaltung von Poly-(ADP-Ribose) - Polymerase mit Hilfe eines Antikörpers getestet wurden. Die 24 Stunden Probe diente dabei als Positivkontrolle für die Apoptose. Eine PARP-Spaltung in den Zellen war, wie erwartet, bei beiden Inhibitoren nach 24 Stunden zu sehen (Abbildung 8 C), d.h. in diesen Zellen findet Apoptose statt. Bei 30 Minuten hingegen war keine PARP-Spaltung zu detektieren und die Zellen sind entsprechend vital.



**Abbildung 8: Auswirkungen einer CK2-Hemmung auf die CK2-Untereinheiten, die CK2-Aktivität und die Zellviabilität.** INS-1 832/13 Zellen wurden für 30 min bzw. 24 h mit CX-4945 (10 µM), oder Quinalizarin (50 µM) behandelt. Die Experimente A-C wurden mit den gleichen Extrakten durchgeführt. Als Lösemittelkontrolle diente DMSO **A**: Western Blot Analyse der CK2-Untereinheiten α (42 kDa), α' (38 kDa) und β (26 kDa). α-Tubulin diente als Ladekontrolle (50 kDa). **B**: *In vitro*-Kinaseassay zur Ermittlung der rel. CK2-Kinaseaktivität. Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten, \*\**P* ≤ 0.01. **C**: Western Blot Analyse der PARP-Spaltung (PARP: 116 kDa, Spaltprodukt: 89 kDa) zur Überprüfung der Zellviabilität. α-Tubulin diente als Ladekontrolle (50 kDa).

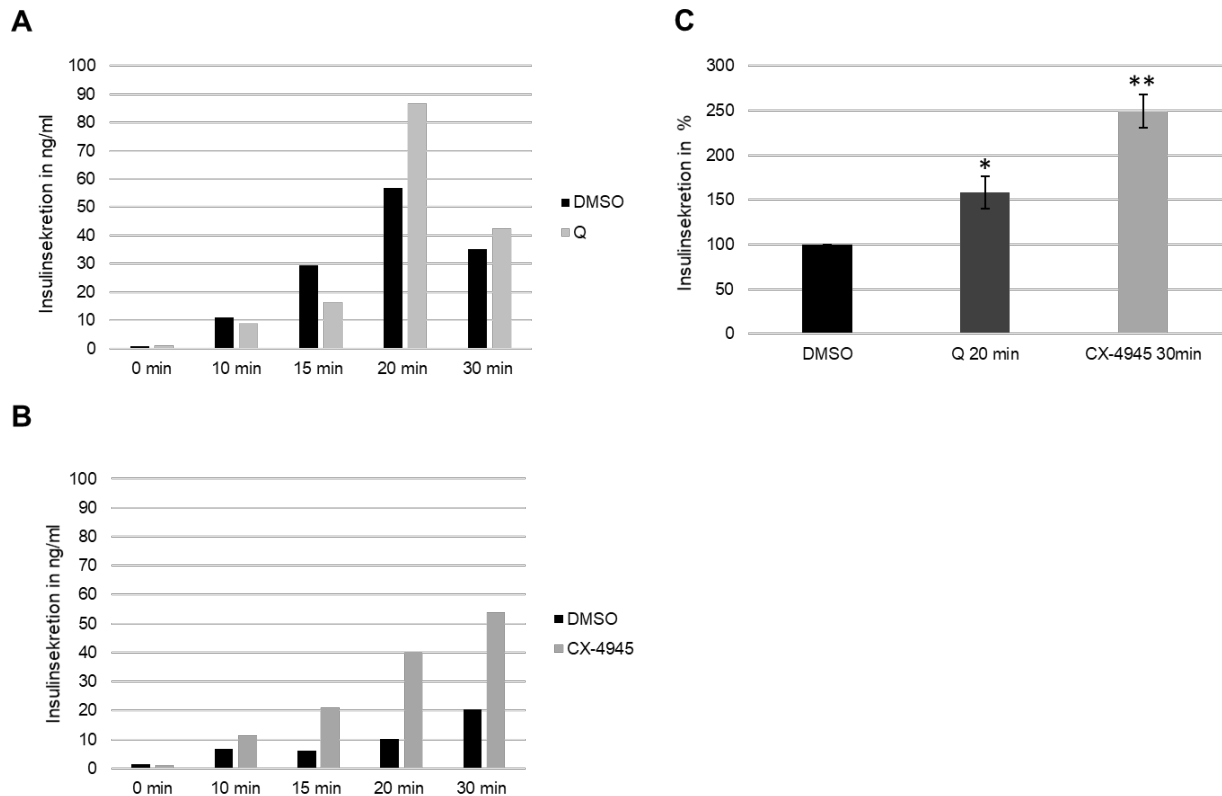
Da nach einer 24-stündigen Behandlung keine deutlich größere Reduktion der Kinaseaktivität erreicht werden konnte (Abbildung 8 B) und bei einer längeren Behandlung Apoptose in den Zellen stattfindet (Abbildung 8 C), wurde die kürzere Behandlungszeit von 30 Minuten für darauffolgende Experimente gewählt. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die INS-1 832/13 Zellen für die Analysen der vorliegenden Dissertation geeignet sind, wurde anschließend die Auswirkungen einer Inhibition der CK2 auf die Insulinsekretion und die intrazelluläre Calciumkonzentration untersucht.

## 6.2 Auswirkungen einer CK2-Inhibition auf die Insulinsekretion

Um die Auswirkungen einer Inhibition der CK2 auf die Insulinsekretion in INS-1 832/13 Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen zunächst in Glucose-freiem Medium gehungert und anschließend in Glucose-freiem Krebs-Ringer Bicarbonat-HEPES Puffer (KRBH) inkubiert, um

die Zellen mit dem Puffersystem vertraut zu machen. Danach wurde der Glucose-freie Puffer zur Stimulation der Insulinsekretion durch KRBH mit 10 mM Glucose ausgetauscht. Gleichzeitig mit dem Austausch des Puffersystems erfolgte eine Zugabe von CX-4945 (10  $\mu$ M) oder Quinalizarin (50  $\mu$ M). Nach verschiedenen Zeitpunkten (0 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min) wurden Medienüberstände abgenommen und das freigesetzte Insulin mittels eines ELISA nachgewiesen. Die Abbildungen 9 A und 9 B zeigen ein repräsentatives Experiment einer Messung des Verlaufs der Insulinsekretion nach einer CK2-Hemmung. Nach einem Glucose-Stimulus steigt die Insulinsekretion stetig an. Wird gleichzeitig die CK2 mit Quinalizarin (Q) inhibiert ist die Insulinsekretion nach 20 Minuten um das ca. 1.5-fache erhöht und nach weiteren 10 Minuten noch um das ca. 1.2-fache (Abbildung 9 A). Bei einer Inhibition mit CX-4945 ist die Insulinsekretion schon nach 10 Minuten um das ca. 1.7-fache erhöht. Der Wert steigt weiter an bis sie nach 30 Minuten um das ca. 2.6-fache im Vergleich zur Kontrolle (DMSO) erhöht ist (Abbildung 9 B).

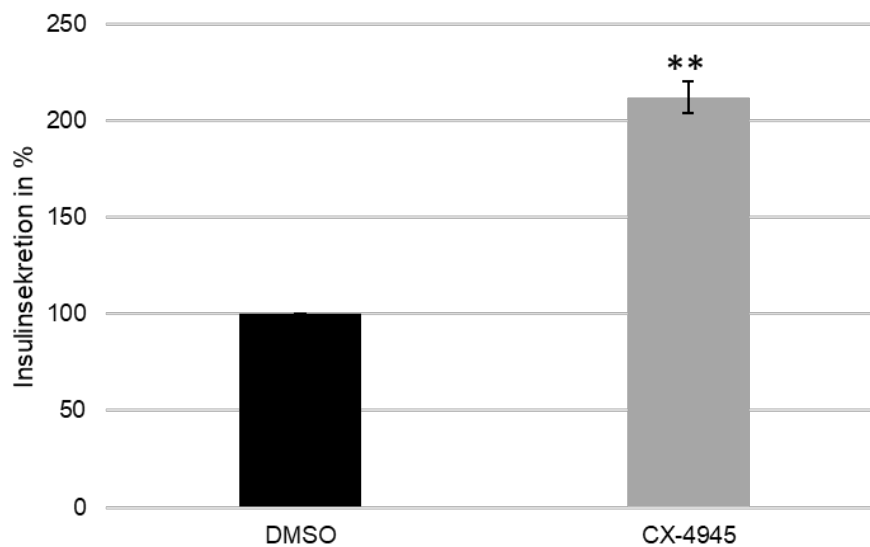
In Abbildung 9 C sind die Zeitpunkte von drei unabhängigen Experimenten nach der Inhibition der CK2 dargestellt, zu welchen die höchste Insulinsekretion gemessen wurde (Quinalizarin: 20 min; CX-4945: 30 min). Nach einer Inhibition der CK2 mit Quinalizarin (Q) ist die Insulinsekretion um ca. 60% signifikant erhöht und nach einer Inhibition der CK2 mit CX-4945 findet eine signifikante Erhöhung der Insulinsekretion um ca. 150% statt.



**Abbildung 9: Insulinsekretion in Medienüberständen von INS-1 832/13 Zellen nach einer Inhibition der CK2 mit Q und CX-4945.** INS-1 832/13 Zellen wurden für 2 h gehungert (RPMI – Glu), für 30 min inkubiert (KRBH – Glu) und für 30 min mit DMSO, CX-4945 (10 µM), oder Quinalizarin (50 µM) behandelt bei gleichzeitiger Stimulation mit Glucose (10 mM). Die Insulinkonzentration der Medienüberstände wurde mittels eines ELISA-Kits ermittelt. DMSO diente dabei als Lösemittelkontrolle. **A:** Insulinsekretion (ng/ml) nach Behandlung mit Quinalizarin (Q, 50 µM) zu den Zeitpunkten 0, 10, 15, 20, und 30 min. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte von Doppelwerten eines repräsentativen Experiments. **B:** Insulinsekretion (ng/ml) nach Behandlung mit CX-4945 (10 µM) zu den Zeitpunkten 0, 10, 15, 20, und 30 min. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte von Doppelwerten eines repräsentativen Experiments. **C:** Insulinsekretion (%) nach Behandlung mit Quinalizarin (Q, 50 µM, 20 min) und CX-4945 (10 µM, 30 min). Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Doppelwerten,  $**P < 0.01$ .

Im Anschluss wurden die aus den INS-1 832/13 Zellen erhaltenen Ergebnisse in pankreatischen Inseln der Maus (C57B/6) verifiziert. Die murinen pankreatischen Inseln wurden uns dabei freundlicherweise vom Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie in Homburg zur Verfügung gestellt. Das Experiment wurde nur mit CX-4945 als Inhibitor der CK2 durchgeführt, um die Versuchstierzahl möglichst gering zu halten. Da die Langerhans-Inseln eine andere Glucoseresponsivität als die INS-1 Zellen besitzen, erfolgte die Bestimmung des freigesetzten Insulins nach dem Protokoll von Kelly et al. [136]. Die Abbildung 10 zeigt, dass eine Behandlung mit CX-4945 (10 µM) die Insulinsekretion in den murinen pankreatischen

Inseln um ca. 112% signifikant steigert. Somit wird die GSIS sowohl in INS-1 832/13 Zellen als auch in murinen Langerhans-Inseln durch eine CK2-Hemmung signifikant um das 1.5-fache bzw. 1.12-fache gesteigert.



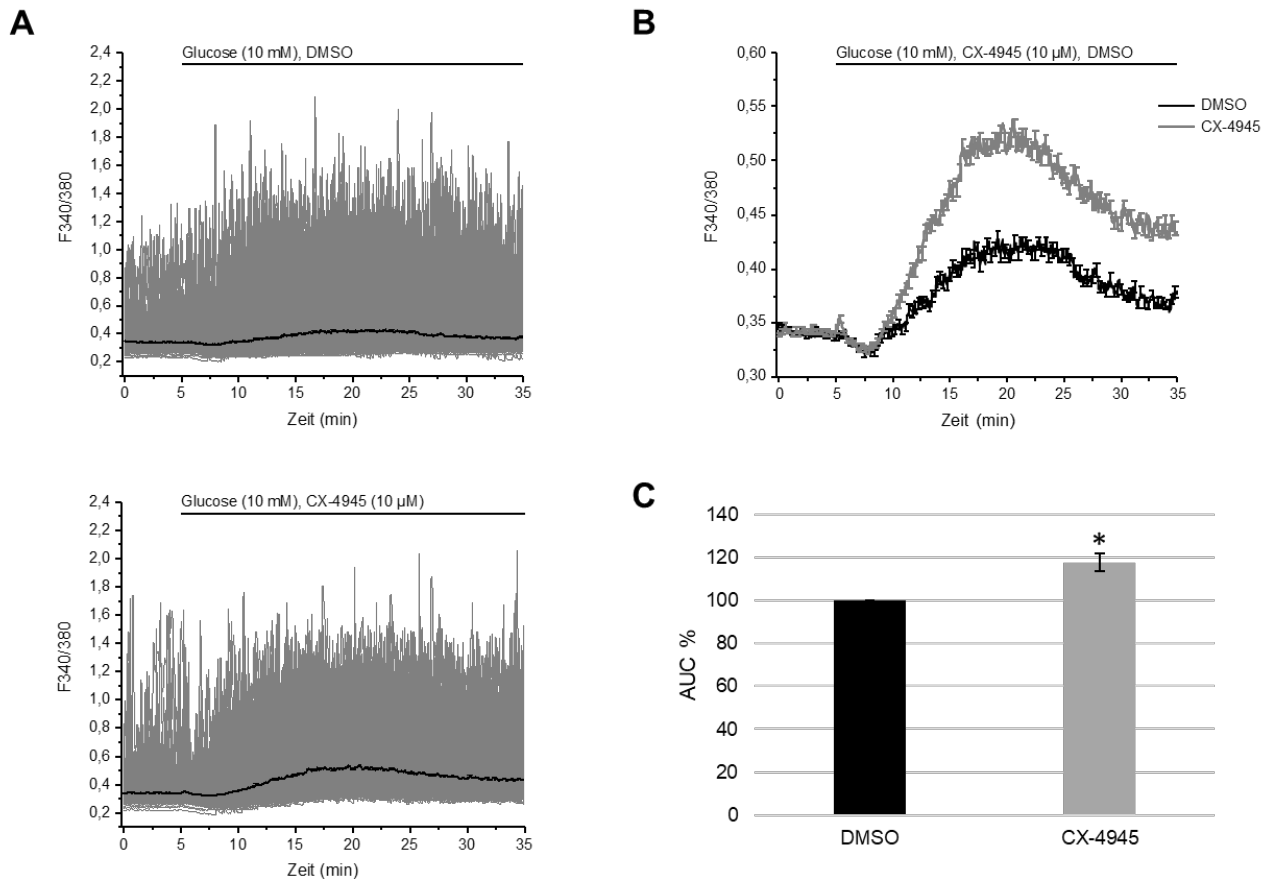
**Abbildung 10: Insulinsekretion in Medienüberständen von murinen Langerhans-Inseln (C57B/6) nach einer Inhibition der CK2 mit CX-4945 [147].** Langerhans-Inseln der Maus (C57B/6) wurden über Nacht gehungert (RPMI -Glu), für 40 min in KRB (1,1 mM Glucose) inkubiert und für 20 min mit DMSO oder CX-4945 (10  $\mu$ M) behandelt bei gleichzeitiger Stimulation mit Glucose (5,6 mM). Der Insulingehalt der Medienüberstände wurde mittels eines ELISA-Kits ermittelt. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Doppelwerten, \*\* $P < 0.01$ .

Nach den Untersuchungen der GSIS wurden anschließend auch die möglichen Folgen einer CK2-Inhibition auf die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration untersucht. Aufgrund der schlechteren Inhibition der CK2-Aktivität (Abbildung 8 B) sowie der deutlich geringeren Erhöhung der Insulinsekretion (Abbildung 9 C) durch Quinalizarin wurden weitere Experimente nur mit dem Inhibitor CX-4945 durchgeführt. Außerdem wird CX-4945 bereits in klinischen Studien eingesetzt [148], weshalb dieser Inhibitor für Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit interessanter ist.

### 6.3 Auswirkungen einer CK2-Inhibition auf die intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration

Nach einer Stimulation mit Glucose wird in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen eine Signalkaskade ausgelöst, welche letztendlich zu einem Öffnen von spannungsabhängigen Calciumkanälen und dadurch zu einem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen führt. Diese vermitteln in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle den Transport von insulinhaltigen Vesikeln zur Membran, wo schließlich deren Exozytose stattfindet.

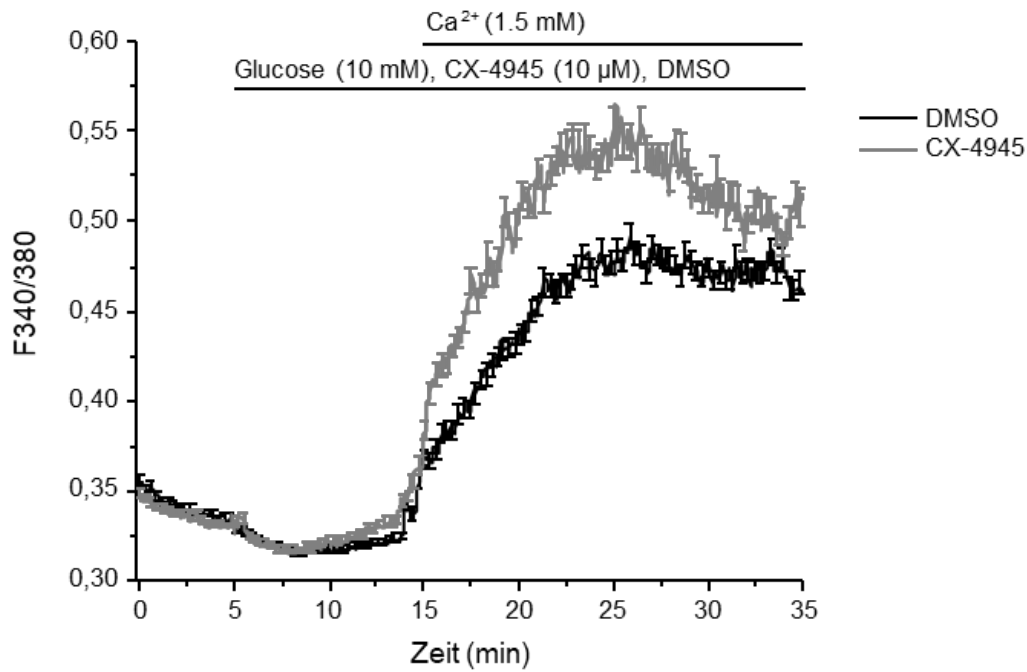
Die gesteigerte Insulinsekretion nach CK2-Hemmung könnte also durch eine veränderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration bedingt sein. Um diese vermutete Kausalität zu überprüfen, wurde im nächsten Schritt die Auswirkungen einer CK2-Inhibition auf die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration untersucht. Dabei wurde mit Hilfe von Fura 2-AM ( $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator) die Fluoreszenzänderungen gemessen und das intrazelluläre Calcium anhand des Verhältnisses 340/380 nm bestimmt. Abbildung 11 A zeigt die Gesamtheit der Fluoreszenzsignale nach einer Behandlung mit CX-4945 (10  $\mu\text{M}$ , Abb. 11 A unten) bzw. die Kontrollbehandlung (Abb. 11 A oben) mit der jeweiligen Mittelwertskurve. Nach der Stimulation mit Glucose (10 mM) ist ein Anstieg der Fluoreszenzsignale zu erkennen. Die Abbildung 11 B zeigt die Mittelwertskurven ohne die Gesamtheit der Fluoreszenzsignale. Es zeigt sich, dass eine Inhibition der CK2 mit CX-4945 (10  $\mu\text{M}$ , Abb. 11 B, graue Kurve) eine deutliche Steigerung der Fluoreszenzsignale und damit der intrazellulären Calciumionenkonzentration zur Folge hat. Der Vergleich der Flächen unter den Kurven (area under the curve = AUC) verdeutlicht, dass nach einer Behandlung mit CX-4945 (10  $\mu\text{M}$ ) die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration signifikant um das ca. 1.2-fache erhöht ist (Abbildung 11 C).



**Abbildung 11: Intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration in INS-1 832/13 Zellen nach einer Inhibition der CK2 mit CX-4945.** INS-1 832/13 Zellen wurden für 2 h gehungert (RPMI, -Glu), für 30 min (KRBH -Glu) bei gleichzeitiger Beladung mit Fura 2-AM (Endkonz.: 5 ng/ $\mu$ l) inkubiert. Die Messung wurde in KRBH -Glu gestartet. Nach 5 min wurden die Zellen mit CX-4945 (10  $\mu$ M), bei gleichzeitiger Stimulation mit Glucose (10 mM), behandelt. DMSO diente als Lösemittelkontrolle. **A:** Gesamtheit der Fluoreszenzsignale nach Behandlung mit CX-4945 (10  $\mu$ M, unten) und die dazugehörigen Mittelwertskurven (schwarze Linie) mit insgesamt 480 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3/480). Kontrolle: oben, mit insgesamt 514 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3/514). Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten. **B:** Verlauf der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration nach Behandlung mit CX-4945 (10  $\mu$ M, graue Linie, n=3/480) und Stimulation mit Glucose (10 mM) als Mittelwertskurve. Kontrolle: schwarze Linie, n=3/514. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten. **C:** Area under the curve (AUC, ab Minute 5, Vgl. B) nach Behandlung der INS-1 Zellen mit CX-4945 (10  $\mu$ M, grau, n=3/480). Kontrolle: schwarz, n=3/514. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten, \* $P$  = 0.05.

Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Inhibition der CK2 kann sowohl durch einen Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  als auch durch eine Freisetzung aus intrazellulären Calcium Speichern bedingt sein. Um die Frage zu klären wodurch die Erhöhung bedingt ist, wurde ein „readdition“-Experiment durchgeführt. Dabei wurde erst im Verlauf der Messung Calcium hinzugefügt und zuvor in einem Calcium-freien Puffer gearbeitet und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration nach Stimulation mit

Glucose (10 mM) und CK2-Hemmung (CX-4945, 10  $\mu$ M) bestimmt.



**Abbildung 12: „readdition“-Experiment nach Stimulation mit Glucose und Inhibition der CK2 mit CX-4945.** INS-1 832/13 Zellen wurden für 2 h gehungert (RPMI -Glu), für 30 min in KRBH (-Glu,  $-\text{Ca}^{2+}$ ) inkubiert und gleichzeitig mit Fura 2-AM (5 ng/ $\mu$ l) beladen. Die Messung wurde in KRBH (-Glu,  $-\text{Ca}^{2+}$ ) gestartet. Nach 5 min wurden die Zellen mit CX-4945 (10  $\mu$ M) bei gleichzeitiger Stimulation mit Glucose (10 mM) behandelt. Nach weiteren 10 min wurde  $\text{CaCl}_2$  (Endkonz.: 1,5 mM in KRBH) hinzugefügt und für weitere 15 min gemessen. Als Lösemittelkontrolle diente DMSO. Gezeigt ist der Verlauf der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration als Mittelwertskurve. Schwarze Linie: DMSO, mit insgesamt 535 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten ( $n=3/535$ ), graue Linie: CX-4945, mit insgesamt 424 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten ( $n=424$ ). Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Abbildung 12 zeigt, dass erst nach einer Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Endkonz.: 1,5 mM in KRBH) zur Lösung eine deutliche Oszillation der Zellen stattfindet. Die alleinige Stimulation mit Glucose (10 mM) und gleichzeitiger Behandlung mit CX-4945 (10  $\mu$ M) ist dafür nicht ausreichend. Auch ein Unterschied der Fluoreszenzintensitäten ist erst nach der Zugabe von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  (Endkonz.: 1,5 mM) zu sehen. Wie auch schon in der Abbildung 11 B zu sehen, ist die Intensität der Fluoreszenzsignale nach einer Behandlung mit CX-4945 (10  $\mu$ M) deutlich erhöht. Die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration nach einer Behandlung von CX-4945 (10  $\mu$ M) ist somit durch einen Einstrom von extrazellulärem Calcium



bedingt und nicht durch eine Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern.

#### 6.4 Untersuchungen des spannungsabhängigen Calciumkanals $\text{Ca}_v2.1$ als mögliches Zielmolekül für die Proteinkinase CK2

Eine Inhibition der CK2 hat sowohl einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration als auch eine Steigerung der Insulinsekretion in pankreatischen  $\beta$ -Zellen zur Folge. Daher liegt die Vermutung nahe, dass das Zielmolekül der Proteinkinase CK2 ein spannungsabhängiger Calciumkanal sein könnte. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Insulinsekretion. In dem von uns verwendeten Zellkultursystem, den INS-1 Zellen, sind mehrere Typen von Calciumkanälen exprimiert:  $\text{Ca}_v1.3$ ,  $\text{Ca}_v2.1$  und  $\text{Ca}_v2.3$  (Tabelle 26) [33].

**Tabelle 26 [33]: Spannungsabhängige Calciumkanäle in pankreatischen  $\beta$ -Zellen und Inselzellen.**

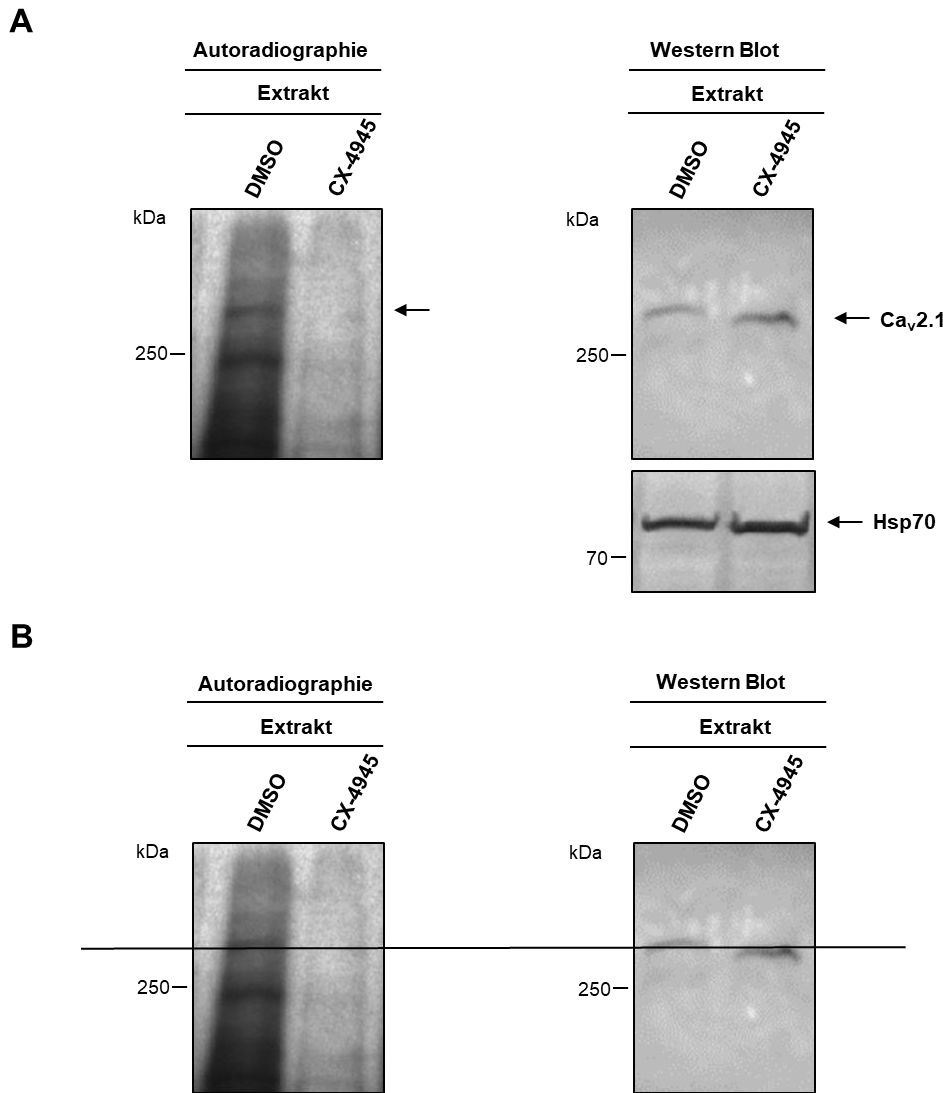
Origin	Cav Channel mRNA						Protein						Current				
	Cav1.2	Cav1.3	Cav2.1	Cav2.2	Cav2.3	Cav3.1	Cav1.2	Cav1.3	Cav2.1	Cav2.2	Cav2.3	Cav3.1	L	P/Q	N	R	T
Human $\beta$ -cell or islet	+	+	+						+		+		+	+	-		+
Rat $\beta$ -cell or islet	+	+	+	+	+	+			+				+	+	?		+
Mouse $\beta$ -cell or islet	+	+	+				+	+					+	+	-	+	-
Hamster HIT-15T	+	+	+				+						+		?		?
Rat INS-1	?	+	+	+	+	+	-	+	+		+		+	+	?	+	+
Rat RINm5F	+	+	+				+	+	+				+	+	?		+
Mouse MIN6	+						+						+				
Mouse $\beta$ TC-3	+	+		+	+		+						+				

$\text{Ca}_v$  channel, voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel; +, positive; -, negative; ?, controversial.

Für die Analysen in der vorliegenden Arbeit wurde der  $\text{Ca}_v2.1$  Subtyp als mögliches Zielmolekül für die CK2 ausgewählt. Zum einen ist dieser sowohl in pankreatischen Inselzellen der Ratte als auch in humanen pankreatischen Inselzellen exprimiert und konnte im Gegensatz zu  $\text{Ca}_v1.3$  als Protein nachgewiesen werden (Tabelle 26). Des Weiteren ist der  $\text{Ca}_v2.1$  Kanal in humanen Inselzellen für ca. 45% der Calciumströme verantwortlich und spielt somit eine zentrale Rolle bei der GSIS [34]. Eine Hemmung des Kanals hat eine Reduktion der GSIS um 60-70% zur Folge [34]. Außerdem wurde bereits durch Kahle et al. [149] in einem Hefe-Zwei-Hybrid-System gezeigt, dass die CK2 $\beta$ -Untereinheit mit dem  $\text{Ca}_v2.1$  interagiert.

### 6.4.1 Untersuchung der Phosphorylierung des endogenen Ca<sub>v</sub>2.1 durch die CK2

Als erster Schritt zur Evaluation des Ca<sub>v</sub>2.1 Kanals als potentielles Zielmolekül für die CK2 wurde die Phosphorylierung des endogenen Volllängen Ca<sub>v</sub>2.1 Kanals untersucht. Dabei wurde die  $\alpha_1$ -Untereinheit des Kanals untersucht, da diese die Ionen-Pore bildet und für die biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften des Kanals verantwortlich ist [27]. Zudem konnte bereits sowohl eine *in vitro* als auch eine *in vivo* Phosphorylierung der Ca<sub>v</sub> $\alpha_1$ -Untereinheit verschiedener Subtypen nachgewiesen werden [19, 54, 150, 151]. Im weiteren Verlauf wird die  $\alpha_1$ -Untereinheit von Ca<sub>v</sub>2.1 (Ca<sub>v</sub> $\alpha_{1A}$ ) als Ca<sub>v</sub>2.1 bezeichnet. Für die Untersuchung wurden INS-1 832/13 Zellen zur Hemmung der CK2 mit CX-4945 (10  $\mu$ M) behandelt. Die Proteine aus Gesamtzellextrakten wurden dann zunächst auf eine PVDF-Membran geblottet und anschließend hinsichtlich einer Phosphorylierung durch die CK2 mit Hilfe eines *in vitro* Phosphorylierungsassays mit radioaktivem [<sup>32</sup>P]-Phosphat untersucht. Dabei wurde die Eigenschaft der CK2, als Phosphatdonor GTP verwenden zu können, genutzt [73, 89] und der Phosphorylierungsassay mit [<sup>32</sup>P]- $\alpha$ -GTP durchgeführt. Um eine Phosphorylierung dem Ca<sub>v</sub>2.1 Kanalprotein zuordnen zu können, wurde eine Immundetektion mit der zuvor verwendeten PVDF-Membran durchgeführt. Abbildung 13 A zeigt die Autoradiographie (links) und die Western Blot Analyse (rechts). Der Autoradiographiefilm zeigt im Gesamten eine deutlich schwächere Phosphorylierung nach einer Behandlung der INS-1 832/13 Zellen mit CX-4945. Bei der Kontrolle ist eine Proteinbande bei ca. 280 kDa zu sehen, welche dem Ca<sub>v</sub>2.1 Protein entsprechen könnte. Im Anschluss an die Western Blot Analyse wurde der Film passgenau auf die entwickelte Blotmembran gelegt. Die detektierte Ca<sub>v</sub>2.1 Proteinbande des Western Blots entsprach dabei der möglichen Ca<sub>v</sub>2.1 Phosphorylierungsbande. Zum Vergleich ist in der Abbildung 13 B eine Linie auf Höhe der möglichen Bande zwischen dem Autoradiographiefilm und dem Western Blot gezogen worden.



**Abbildung 13: CK2-Phosphorylierung des endogenen  $\text{Ca}_v2.1$ -Kanals.** INS-1 832/13 Zellen wurden für 2 h in RPMI -Glu gehungert, für 30 min inkubiert in KRBH -Glu inkubiert und für 30 min mit CX-4945 (10  $\mu\text{M}$ ) behandelt bei gleichzeitiger Stimulation mit Glucose (10 mM). Die Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und mit Lysepuffer aufgeschlossen. Der Gesamtproteingehalt wurde mittels Bradford-Assay ermittelt. Anschließend erfolgte ein CK2 Phosphorylierungsassay mit den Extrakten (80  $\mu\text{g}$ ) und gereinigtem CK2-Holoenzym. Nach Zugabe von  $[^{32}\text{P}]\text{-}\alpha\text{-GTP}$  (2  $\mu\text{Ci}$ ) wurden die Proben inkubiert (30 min, 37°C). Die Auftrennung der phosphorylierten Extrakte erfolgte auf einem SDS-Polyacrylamidgel mit anschließendem Western Blot. Die Blotmembran wurde getrocknet, autoradiographisch analysiert und eine Immundetektion mit einem spezifischen Antikörper gegen  $\text{Ca}_v2.1$  (abcam ab181371) wurde durchgeführt. Molekulargewichtsmarker: ThermoFisher™ PageRuler™ Plus Prestained 10-250 kDa. **A: Links:** Autoradiographiefilm der behandelten Extrakte. **Rechts:** Western Blot zu der Autoradiographie Analyse. Immundetektion mit  $\text{Ca}_v2.1$  Antikörper (abcam ab181371, ~280 kDa). Als Ladekontrolle diente HSP70. **B:** Vergleich (durchgezogene Linie) der Banden von  $\text{Ca}_v2.1$  des Western Blots (rechts) mit der möglichen Phosphorylierungsbande für  $\text{Ca}_v2.1$  (links).

Da es sich um Gesamtzellextrakt bei der Probe handelt kann die Phosphorylierungsbande nicht eindeutig dem Ca<sub>v</sub>2.1 Protein zugewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse des Western Blot legen jedoch die Vermutung einer Phosphorylierung des endogenen Ca<sub>v</sub>2.1 Proteins durch die CK2 nahe.

#### **6.4.2 *In silico* Suche möglicher CK2-Phosphorylierungsstellen im Ca<sub>v</sub>2.1**

Der nächste Schritt war deshalb die Identifizierung konkreter CK2-Phosphorylierungsstellen in Ca<sub>v</sub>2.1. Die minimale Konsensussequenz für Substrate der CK2 lautet S/TxxD/E [70]. Ca<sub>v</sub>2.1 besitzt mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen für die CK2. Um die Untersuchungen auf die wichtigsten Stellen zu begrenzen, wurden die *in vitro* Analysen hauptsächlich auf den C-Terminus beschränkt, da dort bereits eine Interaktion der CK2 $\beta$ -Untereinheit beschrieben wurde [149]. Für die späteren *in vitro* Analysen wurde der Ca<sub>v</sub>2.1 aus der Maus (*Mus musculus*, CACNA1A, GenBank: AY714490.1) verwendet. Die Sequenz besitzt 99% Übereinstimmung mit der Ca<sub>v</sub>2.1 Sequenz der Ratte (*Rattus norvegicus*, GenBank XP\_017456671.1) und 87% Übereinstimmung mit der humanen Ca<sub>v</sub>2.1 Sequenz (*Homo sapiens*, GenBank AAB64179.1). Eine *in silico* Analyse ([www.prosite.expasy.org](http://www.prosite.expasy.org) und <http://www.cbs.dtu.dk>) der Aminosäuresequenz des C-Terminus von Ca<sub>v</sub>2.1 ermittelte zehn potenzielle Stellen für eine CK2-Phosphorylierung (Abbildung 14). Davon sind acht Stellen zwischen Maus, Ratte und Mensch konserviert.

## Ergebnisse

Mus musculus	NFEYLTRDSSILGPHHLDEYVRVWAEYDPAACGRIHYKDMYSLLR	1808
Rattus norvegicus	NFEYLTRDSSILGPHHLDEYVRVWAEYDPAACGRIHYKDMYSLLR	1808
Homo sapiens	NFEYLTRDSSILGPHHLDEYVRVWAEYDPAAWGRMPYLDMYQMLR	1856
Mus musculus	VISPPGLGLGKKCPHRVACKRLLRMDLPVADDNTVHFNSTLMALIR <b>T</b> ALDIKIAGGADKQ	1868
Rattus norvegicus	VISPPGLGLGKKCPHRVACKRLLRMDLPVADDNTVHFNSTLMALIR <b>T</b> ALDIKIAGGADKQ	1868
Homo sapiens	HMSPPGLGLGKKCPARVAYKRLLRMDLPVADDNTVHFNSTLMALIR <b>T</b> ALDIKIAGGADKQ	1916
Mus musculus	QMDAELRKEMMAIWPNLSQKTLDLLVTPHKSTDLTVGKIYAAMMIMEYYRQSKAKKLQAM	1928
Rattus norvegicus	QMDAELRKEMMAIWPNLSQKTLDLLVTPHKSTDLTVGKIYAAMMIMEYYRQSKAKKLQAM	1928
Homo sapiens	QMDAELRKEMMAIWPNLSQKTLDLLVTPHKSTDLTVGKIYAAMMIMEYYRQSKAKKLQAM	1976
Mus musculus	REEQNRTPLMFQRMPEPSPPTQEGGPSQNALPS <b>T</b> QLDPGGGLMAHEGGMKESPSWVTQRAQ	1988
Rattus norvegicus	REEQNRTPLMFQRMPEPSPPTQEGGPSQNALPS <b>T</b> QLDPGGGLMAQESSMKESPSWVTQRAQ	1988
Homo sapiens	REEQDRTPLMFQRMPEPSPPTQEGGPSQNALPS <b>T</b> QLDPGGALMAHESGLKESPSWVTQRAQ	2036
Mus musculus	EMFQKTGTWSPERGPPIDMPNSQPNSSQSVEMREMGTGYS <b>S</b> DSEHYLPMEGQTRAASMPRL	2048
Rattus norvegicus	EMFQKTGTWSPERGPPIDMPNSQPNSSQSVEMREMGTGYS <b>S</b> DSEHYLPMEGQTRAASMPRL	2048
Homo sapiens	EMFQKTGTWSPEQGPPTDMPNSQPNSSQSVEMREMGRDYS <b>S</b> DSEHYLPMEGQGRAASMPRL	2096
Mus musculus	PAENQRRRGRPRGNDLS <b>T</b> ISDTSMPKRSASVLGPKARRLDDYSLERVPEENQRYHQRRR	2108
Rattus norvegicus	PAENQRRRGRPRGNNLS <b>T</b> ISDTSMPKRSASVLGPKARRLDDYSLERVPEENQRYHQRRR	2108
Homo sapiens	PAENQRRRGRPRGNNLS <b>T</b> ISDTSMPKRSASVLGPKARRLDDYSLERVPEENQRHHQRRR	2156
Mus musculus	DRGHRTSERSLGRY <b>T</b> DVDTLGLTDLSTTQSGDLPSKDRDQDRGRPKDRKHPHHHHHHH	2168
Rattus norvegicus	DRGHRTSERSLGRY <b>T</b> DVDTLGLTDLSTTQSGDLPSKDRDQDRGRPKDRKHPHH-HHHH	2167
Homo sapiens	DRSHRASERSLGRY <b>T</b> DVDTLGLTDLSTTQSGDLPSKERDQERGRPKDRKHQH-HHHHH	2215
Mus musculus	HHHHPPAPDRDRIAQERPDTRARAREQRWSR <b>S</b> PSEGREHTTHRQSSSVSGSPAPSTSG	2228
Rattus norvegicus	HHHHPPAPDRERYAQERPDTRARAREQRWSR <b>S</b> PSEGREHATHRQSSSVSGSPAPSTSG	2227
Homo sapiens	HHHHPPPPDKDRIAQERPDHGRARARDQRWSR <b>S</b> PSEGREHMAHRQSSSVSGSPAPSTSG	2275
Mus musculus	TSTPRRGRRQLPQTPCTPRPLVSYSAPRRPAA-----	2261
Rattus norvegicus	TSTPRRGRRQLPQTPCTPRPLVSYSAPRRPAA-----	2260
Homo sapiens	TSTPRRGRRQLPQTPSTPRPHVSYSFVIRKAGSGFPQQQQQQQQQQQAVARPGRAAT	2335
Mus musculus	---RRMAGP-----AAPP-----GSPRGCRR-APRWPAHAP	2289
Rattus norvegicus	---RRMAGP-----PAPP-----GSPRGCRR-APRWPAHAP	2288
Homo sapiens	SGPRRYPGPTAEPLAGDRPPTGGHSSGRSPRMERRVPGPARSESPRACRHGGARWPASGP	2395
Mus musculus	E-----GPRP----RGADY <b>T</b> EPD <b>S</b> PRE-----PPGGAHDPAPRSP	2320
Rattus norvegicus	E-----GPRP----RGADY <b>T</b> EPD <b>S</b> PRE-----PPGGAHEPAPRSP	2319
Homo sapiens	HVSEGPPGPRHHGYRGSYD <b>E</b> ADGPGSGGGEEAMAGYDAPPPVRHASSGATGRSPRTP	2455
Mus musculus	RTPRAAGCASPRHGRRLPNGYYAGHGAPRPRT--ARRGAHDAY <b>S</b> E <b>S</b> EDDWC	2369
Rattus norvegicus	RTPRAAGCASPRHGRRLPNGYYAGHGAPRPRT--ARRGAHDAY <b>S</b> E <b>S</b> EDDWC	2368
Homo sapiens	RASGPACASPSRHGRRLPNGYYPAHGLARPRGPGSRKGLHEPY <b>S</b> E <b>S</b> DDDW	2506

**Abbildung 14: Vergleich der Aminosäuresequenzen des Ca<sub>v</sub>2.1 C-Terminus unterschiedlicher Spezies mit potenziellen CK2-Phosphorylierungsstellen.** Vergleich der Aminosäuresequenzen des C-Terminus von Ca<sub>v</sub>2.1 der Maus (AS 1764-2369, *Mus musculus*, GenBank AY714490.1), der Ratte (AS 1764-2368, *Rattus norvegicus*, GenBank XP\_017456671.1) und des Menschen (AS 1812-2506, *Homo sapiens*, GenBank AAB64179.1). Rot markiert sind die Serine und Threonine welche potenzielle Phosphorylierungsstellen für die CK2 darstellen.

Die zehn potentiellen CK2-Phosphorylierungsstellen wurden in *in vitro* Analysen näher untersucht. Um die Möglichkeit der CK2 als Ektokinase in Betracht zu ziehen wurde ein Serin

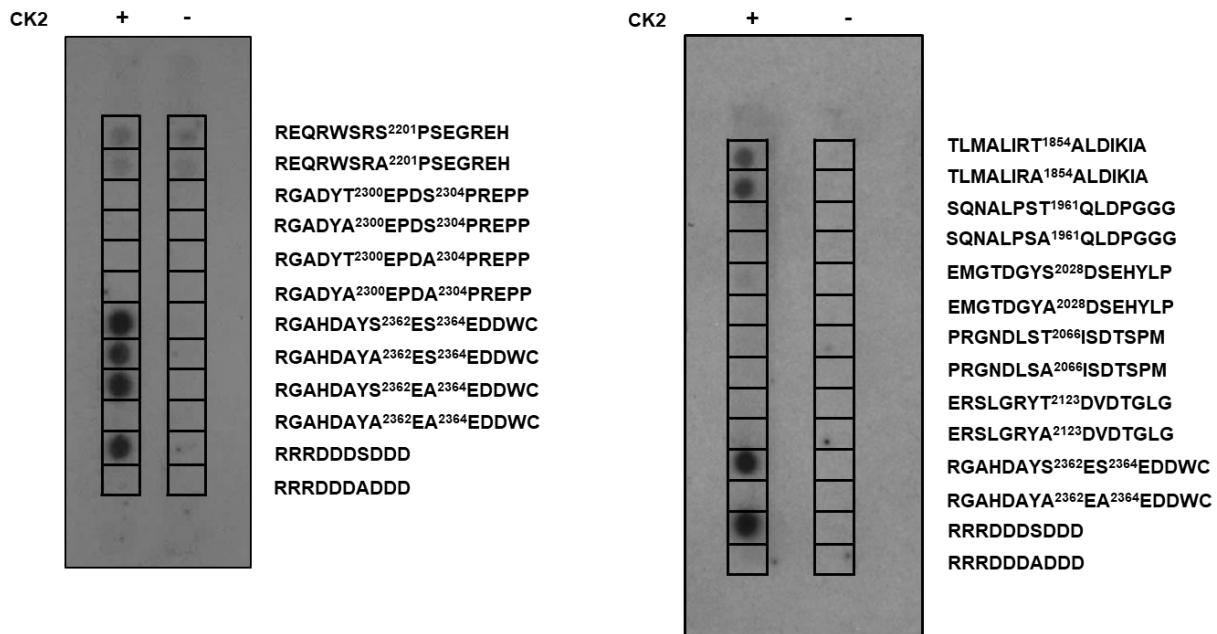
einer extrazellulären Domäne an Position 1677 für weitere Analysen ebenfalls näher untersucht (Abbildung 15). Dieses wurde zu Beginn der Arbeit durch ein weiteres Programm (<https://scansite4.mit.edu/4.0/#home>) ermittelt und ist ebenfalls zwischen Maus, Ratte und Mensch konserviert. Das Serin an Position 1677 war dabei die einzige extrazelluläre CK2-Phosphorylierungsstelle, welche auch bei Hochstringenz noch angezeigt wurde.

<b>Mus musculus</b>	<b>GNIGIDGEDED</b> <b>S</b> DEDEFQITEHN 1688
<b>Rattus norvegicus</b>	<b>GNIGIDGEDED</b> <b>S</b> DEDEFQITEHN 1688
<b>Homo sapiens</b>	<b>GNIGIDVEDED</b> <b>S</b> DEDEFQITEHN 1736
<b>Mus musculus</b>	<b>NFRTFFQALMLLFRSATGEAWHNIMLSCLSGKPCDKNSGILTADCGNEF</b> 1737
<b>Rattus norvegicus</b>	<b>NFRTFFQALMLLFRSATGEAWHNIMLSCLSGKPCDKNSGIQKPECGNEF</b> 1737
<b>Homo sapiens</b>	<b>NFRTFFQALMLLFRSATGEAWHNIMLSCLSGKPCDKNSGILTRECGNEF</b> 1784

**Abbildung 15: Vergleich der Aminosäuresequenzen unterschiedlicher Spezies mit der potenziellen CK2-Phosphorylierungsstelle in der extrazellulären Domäne.** Vergleich der Aminosäuresequenzen des C-Terminus von Ca<sub>v</sub>2.1 der Maus (AS 1764-2369, *Mus musculus*, GenBank AY714490.1), der Ratte (AS 1764-2368, *Rattus norvegicus*, GenBank XP\_017456671.1) und des Menschen (AS 1812-2506, *Homo sapiens*, GenBank AAB64179.1). Rot markiert sind die Serine und Threonine welche potenzielle Phosphorylierungsstellen für die CK2 darstellen.

#### 6.4.3 Untersuchungen der *in vitro* Phosphorylierung von Ca<sub>v</sub>2.1 durch die Proteinkinase CK2

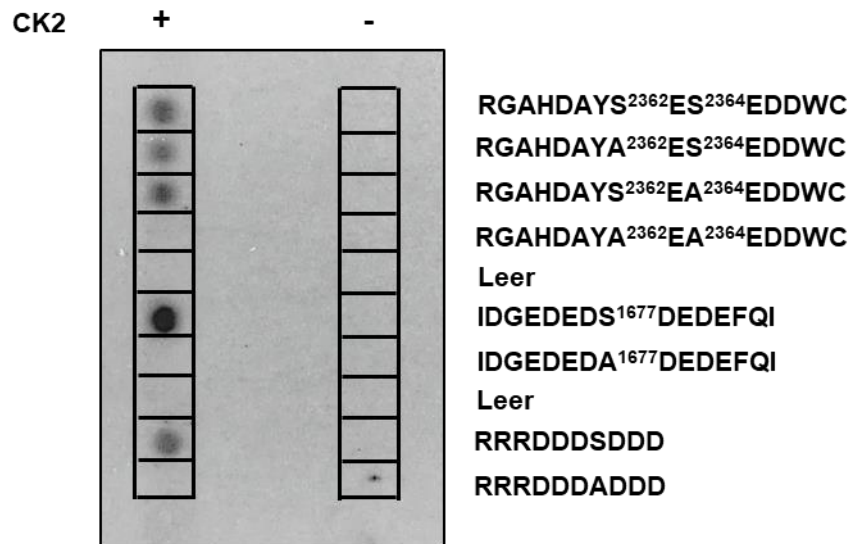
Für eine schnelle Eingrenzung der CK2-Phosphorylierungsstelle wurden Peptidfilteranalysen [152, 153] mit den ermittelten Phosphorylierungsstellen durchgeführt. Dabei wurden Peptide mit je 15 Aminosäuren, welche die zu untersuchenden Serine und ihre jeweiligen Alanin Mutanten umfassten, auf eine Zellulosemembran gespottet (AG Prof. Dr. Martin Jung). Die Membran wurde mit CK2-Holoenzym und [<sup>32</sup>P]-γ-ATP oder als Kontrolle nur mit [<sup>32</sup>P]-γ-ATP inkubiert und autoradiographisch analysiert. Die Abbildung 16 zeigt die Peptidfilter für die potentiellen Phosphorylierungsstellen der CK2 im C-Terminus von Ca<sub>v</sub>2.1.



**Abbildung 16: Untersuchung der potenziellen CK2-Phosphorylierungsstellen im C-Terminus von Ca<sub>v</sub>2.1 mittels Peptidfiltern.** Peptidfilterassay für die in Abbildung 15 dargestellten potenziellen CK2-Phosphorylierungsstellen des Ca<sub>v</sub>2.1 C-Terminus und ihre entsprechenden Mutanten. Peptide mit den potentiellen Phosphorylierungsstellen und Phosphorylierungsmutanten wurden auf Zellulosemembranen gespottet. Die Filter wurden mit EtOH aktiviert, über Nacht in Kinasepuffer (1% BSA) inkubiert und nach mehrmaligem Waschen (Kinasepuffer) am nächsten Tag mit Kinasepuffer und CK2-Holoenzym [<sup>32</sup>P]-γ-ATP (10 μCi) inkubiert (1 h, RT). Anschließend wurden die Membranen getrocknet und autoradiographisch untersucht. Als Kontrolle diente ein Peptid mit der Substratsequenz für die CK2 (RRRDDDSDDD). **Rechts:** Wildtyp und Phosphorylierungsmutante für S2201, T2300, S2304, S2362, S2364. **Links:** Wildtyp und Phosphorylierungsmutante für T1854, T1961, S2028, T2066, T2123, S2362, S2364.

Bei den potentiellen Phosphorylierungsstellen S2201 (Abbildung 16, links) und T1854 (Abbildung 16, rechts) zeigten sich schwache Signale. Diese konnten allerdings auch in den jeweiligen Phosphorylierungsmutanten bzw. in der Kontrollbehandlung ohne CK2 beobachtet werden. Es handelte sich dabei sehr wahrscheinlich um eine unspezifische Bindung von [<sup>32</sup>P]-γ-ATP. Die Serine an den Positionen S2362 und S2364 und ihre jeweiligen Phosphorylierungsmutanten zeigten ein starkes Signal (Abbildung 16, links). Bei einer gleichzeitigen Mutation beider Serine konnte kein Signal mehr detektiert werden, folglich werden beide Serine von der Proteinkinase CK2 phosphoryliert. Für die restlichen Phosphorylierungsstellen konnten keine Signale detektiert werden. Als Positivkontrolle diente ein synthetisches Substratpeptid (RRRDDDSDDD) bzw. die entsprechende Phosphorylierungsmutante (RRRDDDADDD) für die CK2. Wie erwartet, zeigte nur das Substratpeptid, nicht aber die Mutante ein Signal. In der Abbildung 17 ist der Peptidfilter für

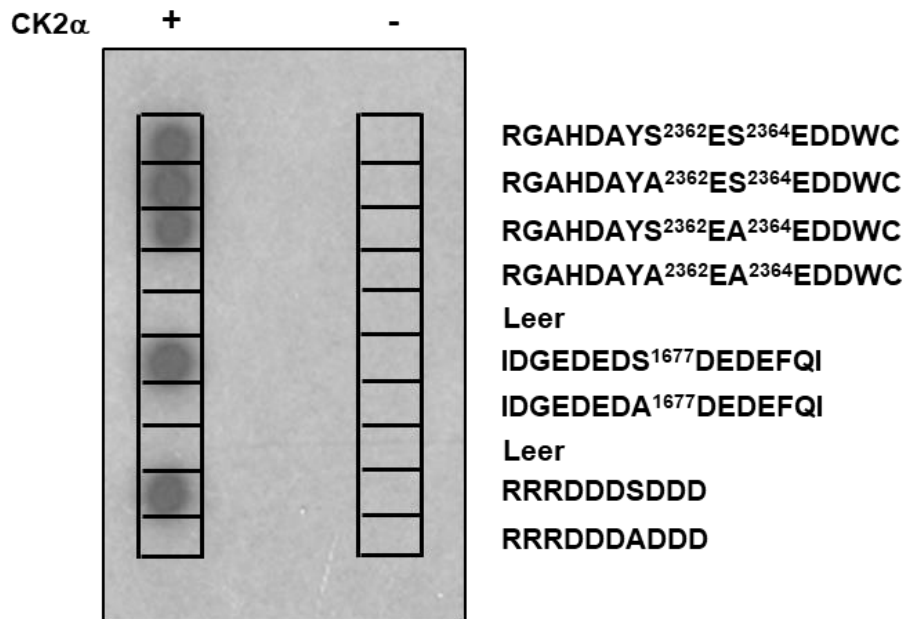
die potentielle extrazelluläre CK2-Phosphorylierungsstelle (S1677) gezeigt. Die Serine an den Positionen 2362 und 2364 dienten als eine weitere Positivkontrolle.



**Abbildung 17: Untersuchung der potenziellen CK2-Phosphorylierungsstellen in einer extrazellulären Domäne von Ca<sub>v</sub>2.1 mittels Peptidfiltern.** Peptidfilterassay für Ca<sub>v</sub>2.1 S1677, S2362 und S2364 und ihre entsprechenden Mutanten. Peptide mit den potenziellen Phosphorylierungsstellen und Phosphorylierungsmutanten wurden auf eine Zellulosemembran gespottet. Die Membran wurde mit EtOH aktiviert, über Nacht in Kinasepuffer (1% BSA) inkubiert und nach mehrmaligem Waschen (Kinasepuffer) am nächsten Tag mit Kinasepuffer und CK2-Holoenzym sowie [<sup>32</sup>P]-γ-ATP (10 μCi) inkubiert (1 h, RT). Anschließend wurde die Membran autoradiographisch untersucht. Als Kontrolle diente ein Peptid mit der Substratsequenz für die CK2 (RRRDDDSDDD). Wildtyp und Phosphorylierungsmutante für S2362, S2364, und S1677.

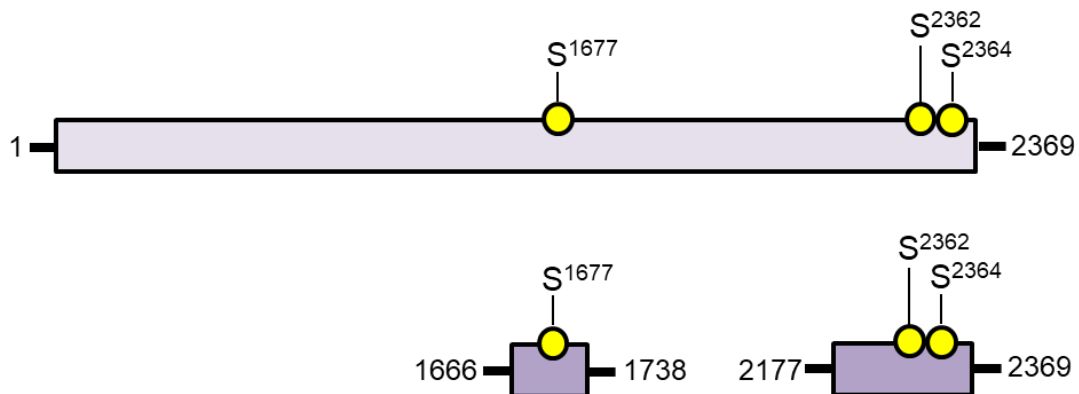
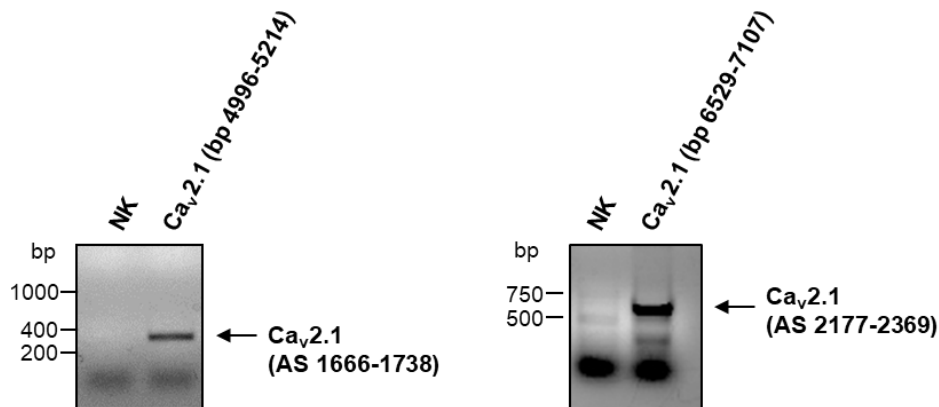
Die Abbildung 17 zeigt, dass bei einer Mutation von S1677 zu Alanin das entsprechende Peptid nicht mehr phosphoryliert wird. Das Serin an Position 1677 stellt somit ebenfalls ein Substrat für die CK2 *in vitro* dar. In einem weiteren Peptidfilter wurde überprüft, ob eine Phosphorylierung der zuvor detektierten Stellen (S1677, S2362, und S2364) auch durch die CK2α-Untereinheit alleine gegeben ist, da es – wie bereits erwähnt - CK2-Substrate gibt, die nur durch das CK2-Holoenzym, nicht aber durch die katalytischen Untereinheiten phosphoryliert werden [87]. Auch hier zeigte sich eine Phosphorylierung für alle drei potentiellen CK2-Phosphorylierungsstellen (Abbildung 18).





**Abbildung 18: Untersuchung der Phosphorylierung von Cav2.1 S1677, S2362 und S2364 durch die CK2α mittels Peptidfiltern.** Peptidfilterassay für Cav2.1 S1677, S2362 und S2364 und ihre entsprechenden Mutanten. Peptide mit den potenziellen Phosphorylierungsstellen und Phosphorylierungsmutanten wurden auf eine Zellulosemembran gespottet. Die Membran wurde mit EtOH aktiviert, über Nacht in Kinasepuffer (1% BSA) inkubiert und nach mehrmaligem Waschen (Kinasepuffer) am nächsten Tag mit Kinasepuffer und CK2α sowie [<sup>32</sup>P]-γ-ATP (10 μCi) inkubiert (1 h, RT). Anschließend wurde die Membran autoradiographisch untersucht. Als Kontrolle diente ein Peptid mit der Substratsequenz für die CK2 (RRRDDDSDDD). Wildtyp und Phosphorylierungsmutante für S2362, S2364, und S1677.

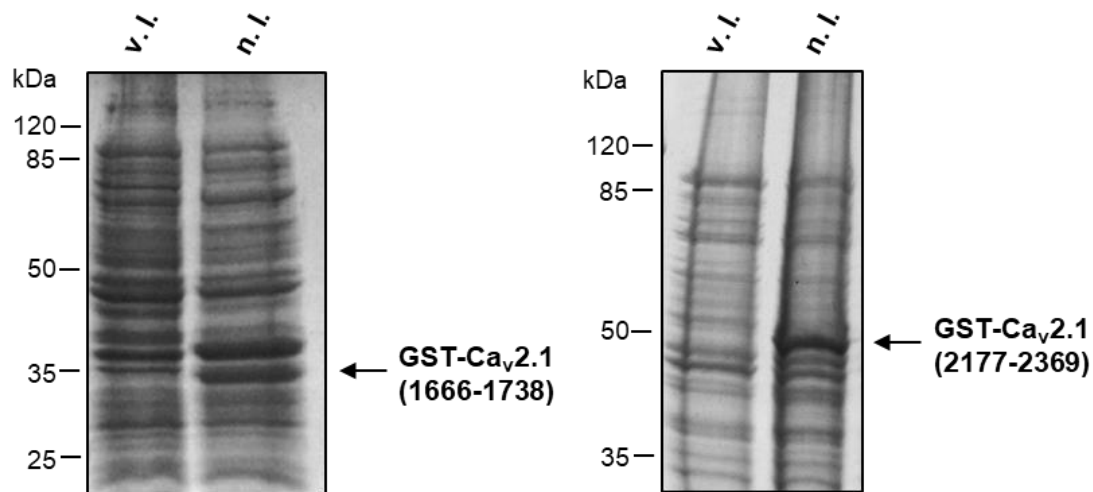
Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurden DNA-Fragmente, welche die gewählten Serine (Position: 1677, 2362, 2364) (Abbildung 19 A) enthielten zunächst mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) amplifiziert. Als Vorlage diente dabei der pcDNA6-Cav2.1 Vektor von Addgene (#26578). Zum einen wurde ein PCR-Fragment hergestellt, welches die Aminosäuren 1666-1738 umfasst, und somit das Serin an Position 1677 enthält (Molekulargewicht 219 bp, Abbildung 19 B links). Zum anderen wurde ein PCR-Fragment, welches die Aminosäuren 2177-2369, also nur einen Teil des C-Terminus, umfasst und die beiden Serine an den Positionen 2362 und 2364 enthielt (Molekulargewicht 576 bp) (Abbildung 19 B rechts), hergestellt.

**A****B**

**Abbildung 19: Volllängen  $\text{Ca}_v2.1$  und die amplifizierte PCR-Fragmente von  $\text{Ca}_v2.1$  (bp 4996-5214) und  $\text{Ca}_v2.1$  (bp 6529-7107).** **A:** Schema des Volllängen  $\text{Ca}_v2.1$  mit den potenziellen CK2-Phosphorylierungsstellen (oben) und der hergestellten DNA-Fragmente von AS 1666-1738 mit Serin 1677 und AS 2177-2369 mit Serin 2362 und 2364 (unten). **B:** Agarose-Gel (1%) der amplifizierten  $\text{Ca}_v2.1$  PCR-Fragmente. **Links:** PCR-Fragment  $\text{Ca}_v2.1$  mit den bp 4996 bis 5214. Größe 219 bp (Bande durch Pfeil gekennzeichnet). Das Fragment umfasst die AS 1666-1738 und enthält das Serin 1677. Molekulargewichtsmarker: GeneRuler™ 50bp DNA Ladder (ThermoFisher). **Rechts:** PCR-Fragment  $\text{Ca}_v2.1$  mit den bp 6529 bis 7107. Größe 576 bp (Bande durch Pfeil gekennzeichnet). Das Fragment umfasst die AS 2177-2369 und enthält die Serine 2362 und 2364. Molekulargewichtsmarker: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (ThermoFisher).

Die DNA-Fragmente wurden jeweils in den pGEX-4T-1 Vektor kloniert, wodurch das später entstehende Protein mit einem GST-Tag versehen ist. Die entstandenen pGEX-4T-1 Plasmide (pGEX-4T-1\_ $\text{Ca}_v2.1$  (1666-1738) und pGEX-4T-1\_ $\text{Ca}_v2.1$  (2177-2369)) wurden durch eine Sequenzierung (Firma: Eurofins Genomics) verifiziert, anschließend in *E. coli* XL-1 blue

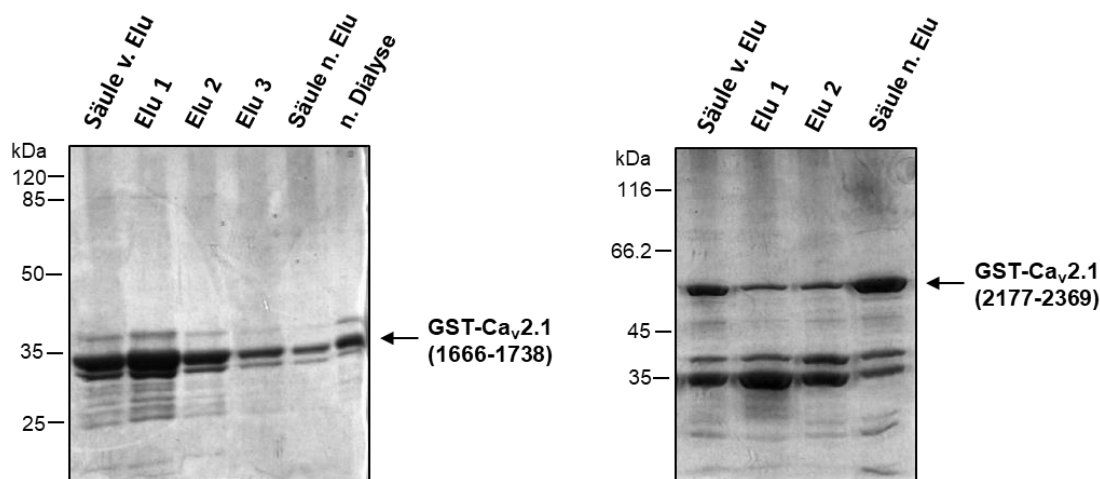
Bakterien transformiert und mittels Induktion durch IPTG als GST-Fusionsproteine exprimiert. Zur Bestätigung der Expression wurden die Bakterien abzentrifugiert und die Proben mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Blau Färbung analysiert. Die Abbildung 20 zeigt, dass in der Probe welche mit IPTG induziert wurde (n.I.) eine zusätzliche Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht (links: GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (1666-1738) ~8 kDa + GST 26 kDa; rechts: GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369) ~21 kDa + GST 26 kDa) detektiert werden konnte. Die Expression der Fusionsproteine konnte somit nachgewiesen werden.



**Abbildung 20: Expressionskontrolle der GST-Ca<sub>v</sub>2.1 Fusionsproteine.** *E. coli* XL-1 Blue Bakterien wurden getrennt mit den Plasmiden pGEX-4T-1\_Ca<sub>v</sub>2.1 (1666-1738) und pGEX-4T-1\_Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369) transformiert und anschließend induziert. Induktionsbedingungen: 37°C, 1 mM IPTG, 2 h. Die Bakteriensuspension (1 ml) wurde abzentrifugiert, das Pellet resuspendiert (30 µl 3x SDS-Probenpuffer) und die Proben (30 µl) mittels SDS-PAGE und Coomassie-Blau Färbung analysiert. Molekulargewichtsmarker: Thermo Scientific™ Pierce™ Prestained Protein Molecular Weight Marker 20-120 kDa. **Links:** Transformation mit pGEX-4T-1\_Ca<sub>v</sub>2.1 (1666-1738), v.l.: Probe vor Induktion, n.I.: Probe nach Induktion. Pfeil: GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (1666-1738), ~37 kDa. **Rechts:** Transformation mit pGEX-4T-1\_Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369), v.l.: Probe vor Induktion, n.I.: Probe nach Induktion. Pfeil: GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369), ~47 kDa.

Daraufhin wurden die Proteine über Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose gereinigt und zum Schluss wieder von der GSH-Sepharose eluiert. Abbildung 21 zeigt die unterschiedlichen Reinigungsschritte. Bei der Reinigung von GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (1666-1738) zeigt sich in den Elutionsfraktionen (Abbildung 21, links Spur Elu 1-3) eine prominente Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht von ~34 kDa. Allerdings konnte auch nach mehrmaliger

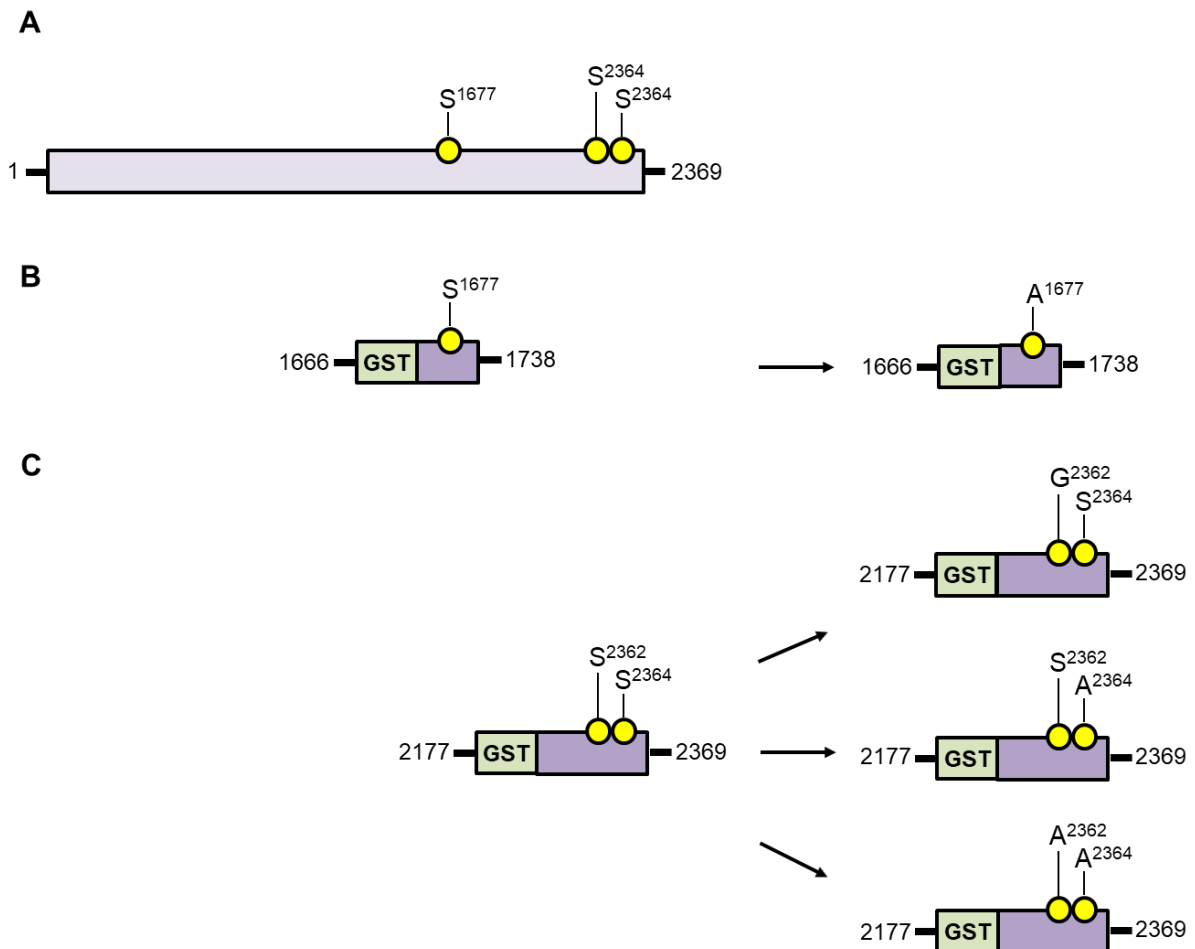
Elution des Protein nicht komplett von der GSH-Sepharose entfernt werden (Abbildung 21, links Spur Säule n. Elu). Nach einer Dialyse der Elutionsfraktionen konnte jedoch eine ausreichende Menge und Konzentration an Protein erzielt werden (Abbildung 21, Spur n. Dialyse). GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369) ließ sich ebenfalls gut an die GSH-Sepharose binden (Abbildung 21, rechts Spur Säule v. Elu, Molekulargewicht 47 kDa), konnte aber nicht in einer solch großen Menge eluiert werden wie GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (1666-1738) (Vgl.: Abbildung 21, rechts Spur Elu 1-2 mit Abbildung 21, links Spur Elu 1-3). Für weitere *in vitro* Analysen wurde daher das an GSH-Sepharose gebundene GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369) verwendet.



**Abbildung 21: Reinigung der GST-Ca<sub>v</sub>2.1 Fusionsproteine.** GST-Ca<sub>v</sub>2.1 Fusionsproteine wurden in *E. coli* XL-1 Blue Bakterien exprimiert und anschließend mittels GSH-Sepharose Affinitätschromatographie gereinigt. Probenbezeichnung: Säule v. Elu: an GSH-Sepharose gebundenes Protein vor Elution (15 µl), Elu 1: erste Elutionsfraktion (15 µl), Elu 2: zweite Elutionsfraktion (15 µl), Elu 3: dritte Elutionsfraktion (15 µl), Säule n. Elu: an GSH-Sepharose gebundenes Protein nach Elution (15 µl), n. Dialyse: gereinigtes und dialysiertes Protein (15 µl). **Links:** SDS-Polyacrylamidgel der GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (1666-1738) Reinigungsschritte. Molekulargewichtsmarker: Thermo Scientific™ Pierce™ Prestained Protein Molecular Weight Marker 20-120 kDa. **Rechts:** SDS-Polyacrylamidgel der GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369) Reinigungsschritte. Molekulargewichtsmarker: Thermo Scientific™ Pierce™ Unstained Protein Molecular Weight Marker 14.4-116 kDa.

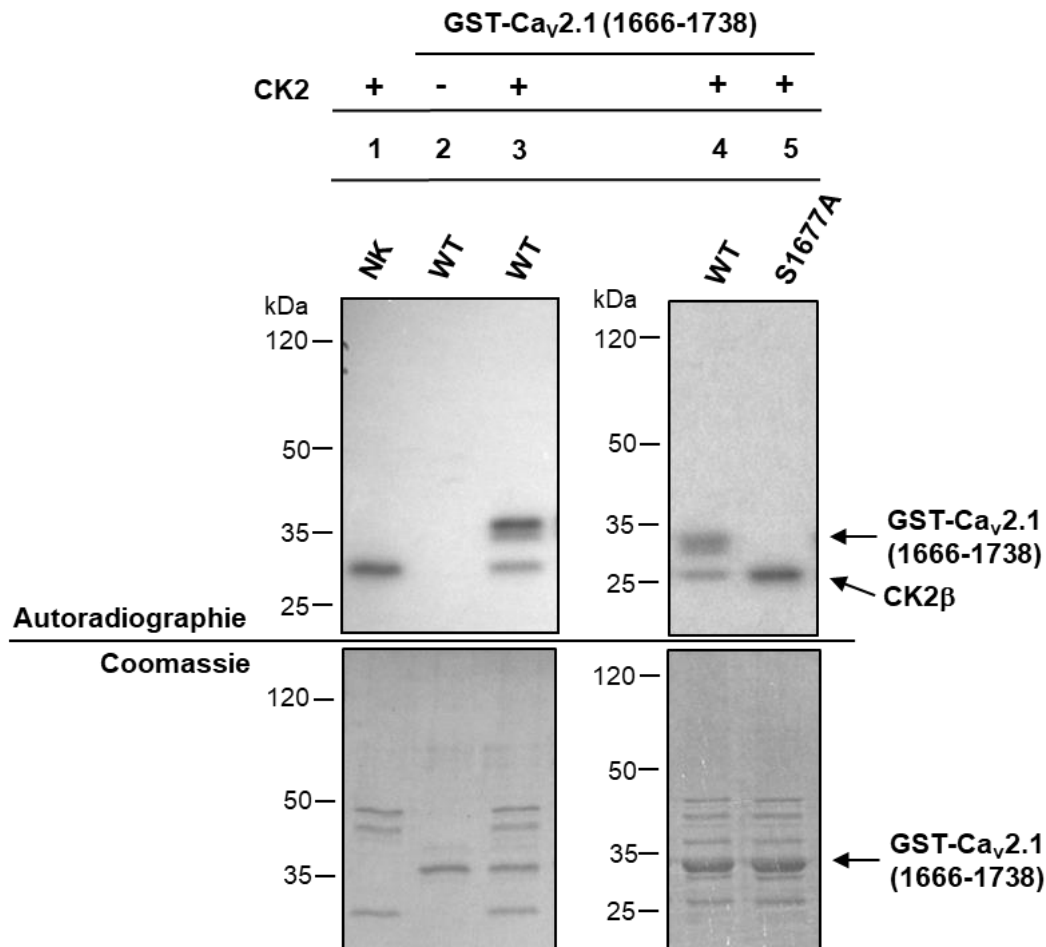
Zur Untersuchung der Serine an Position 1677, 2362 und 2364 hinsichtlich Ihrer Phosphorylierung durch die CK2 *in vitro* wurden auch hier Phosphorylierungsmutanten hergestellt. Dazu wurden die Serine mit Hilfe des Q5® Site-directed Mutagenesis Kits (NEB) zu nicht phosphorylierbaren Aminosäuren ausgetauscht. Das Serin an Position 1677 wurde gegen ein Alanin ausgetauscht (pGEX-4T-1\_Ca<sub>v</sub>2.1 (1666-1738) S1677A), das Serin an

Position 2362 gegen ein Glycin (pGEX-4T-1\_Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369) S2362G) und das Serin an Position 2364 ebenfalls gegen ein Alanin (pGEX-4T-1\_Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369) S2364A). Außerdem wurde eine Doppelmutante erzeugt, wobei die beiden Serine 2362 und 2364 gegen Alanine ausgetauscht wurden (pGEX-4T-1\_Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369) S2362A/S2364A) (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Schematische Darstellung von Ca<sub>v</sub>2.1 und den hergestellten Phosphorylierungsmutanten für GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (1666-1738) und GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369).** Schematisch dargestellt sind die mit Hilfe des Q5® Site-directed Mutagenesis Kits (NEB) hergestellten Phosphorylierungsmutanten. Die Doppelmutante (C, S2362A/S2364A) wurde von der Firma Thermo Fisher *de novo* synthetisiert und anschließend in den pGEX-4T-1 Vektor kloniert. **A:** Vollständige Ca<sub>v</sub>2.1 mit den potentiellen CK2 Phosphorylierungsstellen. **B:** Phosphorylierungsmutante für GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (1666-1738). Das Serin an Position 1677 wurde gegen ein Alanin ausgetauscht. **C:** Phosphorylierungsmutanten für GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369). Das Serin an Position 2362 (oben) wurde gegen ein Glycin ausgetauscht. Das Serin an Position 2364 (mitte) wurde gegen ein Alanin ausgetauscht. An den Positionen 2362 und 2364 wurden statt Serinen (Wildtyp) Alanine synthetisiert.

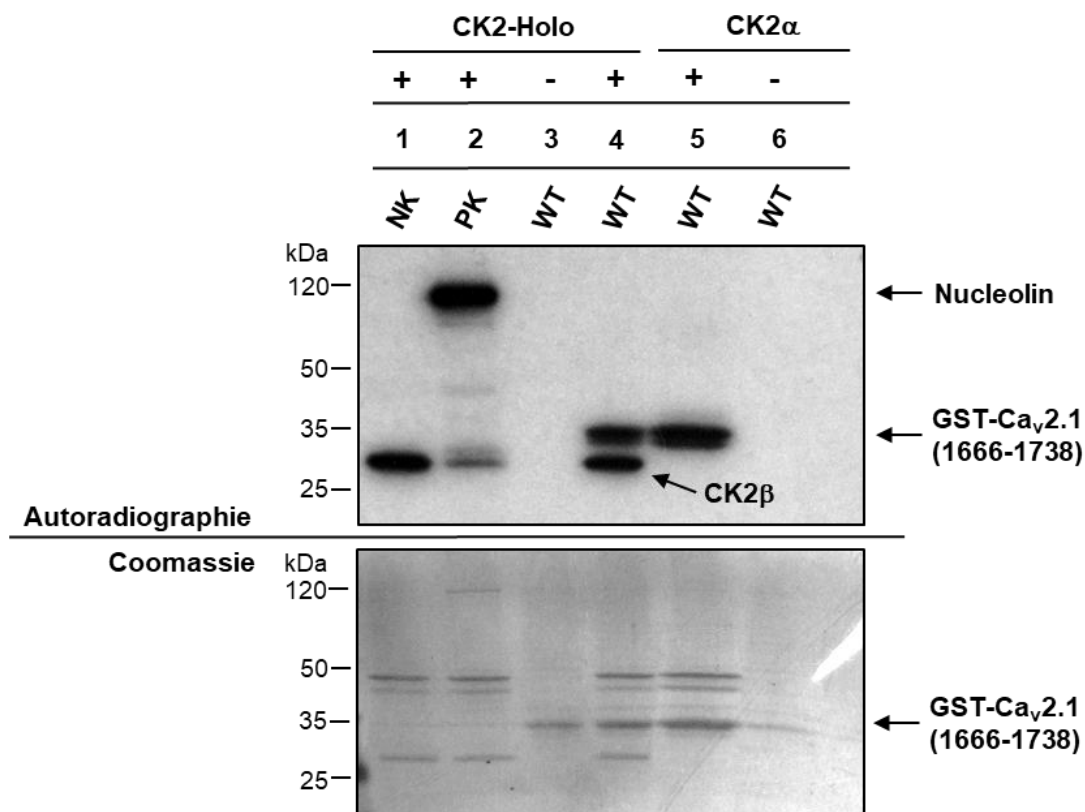
Die Expression und Reinigung erfolgte wie zuvor für die GST-getaggten Wildtyp Proteine GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (1666-1738) und GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369) beschrieben (Abbildung 21). Durch ein *in vitro* CK2-Phosphorylierungsassay wurden die GST-Fusionsproteine anschließend auf eine Phosphorylierung durch die CK2 untersucht. Die Abbildung 23 zeigt die Autoradiographien (oben) mit zugehörigen SDS-Polyacrylamidgelen (unten) für GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (1666-1738) Wildtyp und S1677A Mutante. Bei einer Zugabe von rekombinanter CK2 ist im Vergleich zur Probe ohne CK2 eine Bande bei ca. 37 kDa zu sehen (Abbildung 23, links, oben). GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (1666-1738) wird somit durch die CK2 *in vitro* phosphoryliert. Abbildung 23 (rechts, oben) zeigt den direkten Vergleich von GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (1666-1738) Wildtyp und der S1677A Mutante. Bei dem Wildtyp ist wie zuvor eine Bande bei ca. 37 kDa zu sehen, diese erscheint bei der Mutante allerdings nicht. Das Serin an Position 1677 stellt somit *in vitro* eine Stelle für eine CK2-Phosphorylierung in GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (1666-1738) dar. Die Autophosphorylierung der CK2β diente hierbei als interne Kontrolle.



**Abbildung 23: Nachweis der CK2-Phosphorylierung von GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (1666-1738) an Position S1677.** *In vitro* CK2-Phosphorylierungsassay mit gereinigtem GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (1666-1738) (1 µg) und gereinigtem CK2-Holoenzym. Nach Zugabe von [<sup>32</sup>P]-γ-ATP (2 µCi) wurden die Proben inkubiert (30 min, 37°C). Die Auftrennung der phosphorylierten Proteine erfolgte auf einem SDS-Polyacrylamidgel mit anschließender Analyse durch Autoradiographie. Molekulargewichtsmarker: Thermo Scientific™ Pierce™ Prestained Protein Molecular Weight Marker 20-120 kDa. **Links oben:** Autoradiographie GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (1666-1738) Wildtyp ohne CK2-Holoenzym (Spur 2) und mit CK2-Holoenzym (Spur 3). NK (Spur 1): Negativkontrolle (Probe ohne Zugabe von GST-Fusionsprotein). **Rechts oben:** Autoradiographie GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (1666-1738) Wildtyp (Spur 4) und GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (1666-1738) S1677A Mutante (Spur 5) mit CK2-Holoenzym. **Unten:** Coomassie-Blau Färbung der zugehörigen SDS-Polyacrylamidgelle.

Nachdem die Phosphorylierung von GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (1666-1738) an der Position 1677 durch das CK2-Holoenzym *in vitro* gezeigt werden konnte (Abbildung 23), wurde die zuvor durch Peptidfilteranalysen evaluierte Phosphorylierung durch die CK2α-Untereinheit alleine verifiziert (Abbildung 18). In der Abbildung 24 ist der direkte Vergleich zwischen einer Phosphorylierung mit dem CK2-Holoenzym (Abbildung 24, Spur 4) und der CK2α-Untereinheit (Abbildung 24, Spur 5) zu sehen. Bei einer Zugabe von CK2α ist eine Bande mit demselben Molekulargewicht zu sehen wie auch bei einer Zugabe von CK2-Holoenzym. Die Bande ist

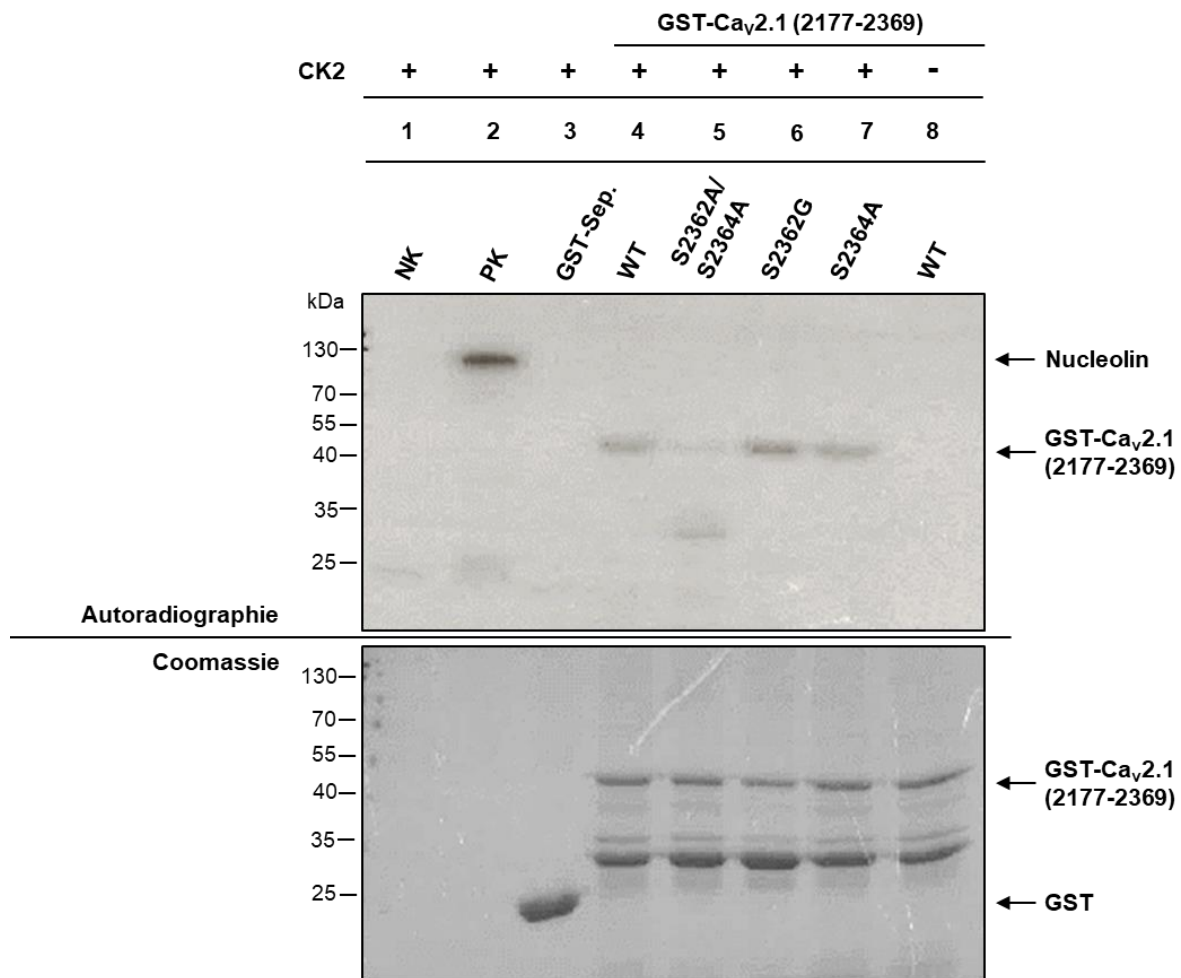
ohne Zugabe von CK2 $\alpha$  (Abbildung 24, Spur 6) oder CK2-Holoenzym (Abbildung 24, Spur 3) nicht zu sehen. Dies zeigt, dass GST-Ca $\nu$ 2.1 (1666-1738) *in vitro* an der Position 1677 auch von der CK2 $\alpha$ -Untereinheit alleine phosphoryliert wird. Die Autophosphorylierung der CK2 $\beta$  diente hierbei wieder als interne Kontrolle. Bei einer Zugabe von CK2 $\alpha$  statt des CK2-Holoenzym ist die Bande für CK2 $\beta$  erwartungsgemäß nicht zu sehen. In der Abbildung 24 (unten) ist das zugehörige Coomassie-Blau gefärbte SDS-Polyacrylamidgel zu sehen.



**Abbildung 24: Nachweis der Phosphorylierung von GST-Ca $\nu$ 2.1 (1666-1738) an Position S1677 durch die CK2 $\alpha$ -Untereinheit.** *In vitro* CK2-Phosphorylierungsassay mit gereinigtem GST-Ca $\nu$ 2.1 (1666-1738) (1  $\mu$ g) und gereinigtem CK2-Holoenzym bzw. gereinigter CK2 $\alpha$ . Nach Zugabe von [ $^{32}$ P]- $\gamma$ -ATP (2  $\mu$ Ci) wurden die Proben inkubiert (30 min, 37°C). Die Auftrennung der phosphorylierten Proteine erfolgte auf einem SDS-Polyacrylamidgel mit anschließender Autoradiographie. Molekulargewichtsmarker: Thermo Scientific™ Pierce™ Prestained Protein Molecular Weight Marker 20-120 kDa. **Oben:** Autoradiographie GST-Ca $\nu$ 2.1 (1666-1738) Wildtyp, Spur 3: ohne CK2-Holoenzym, Spur 4: mit CK2-Holoenzym, Spur 5: mit CK2 $\alpha$ , Spur 6: ohne CK2 $\alpha$ , NK (Spur 1): Negativkontrolle (Probe ohne Zugabe von GST-Fusionsprotein), PK (Spur 2): Nucleolin mit CK2-Holoenzym. **Unten:** Coomassie-Blau Färbung des zugehörigen SDS-Polyacrylamidgels.



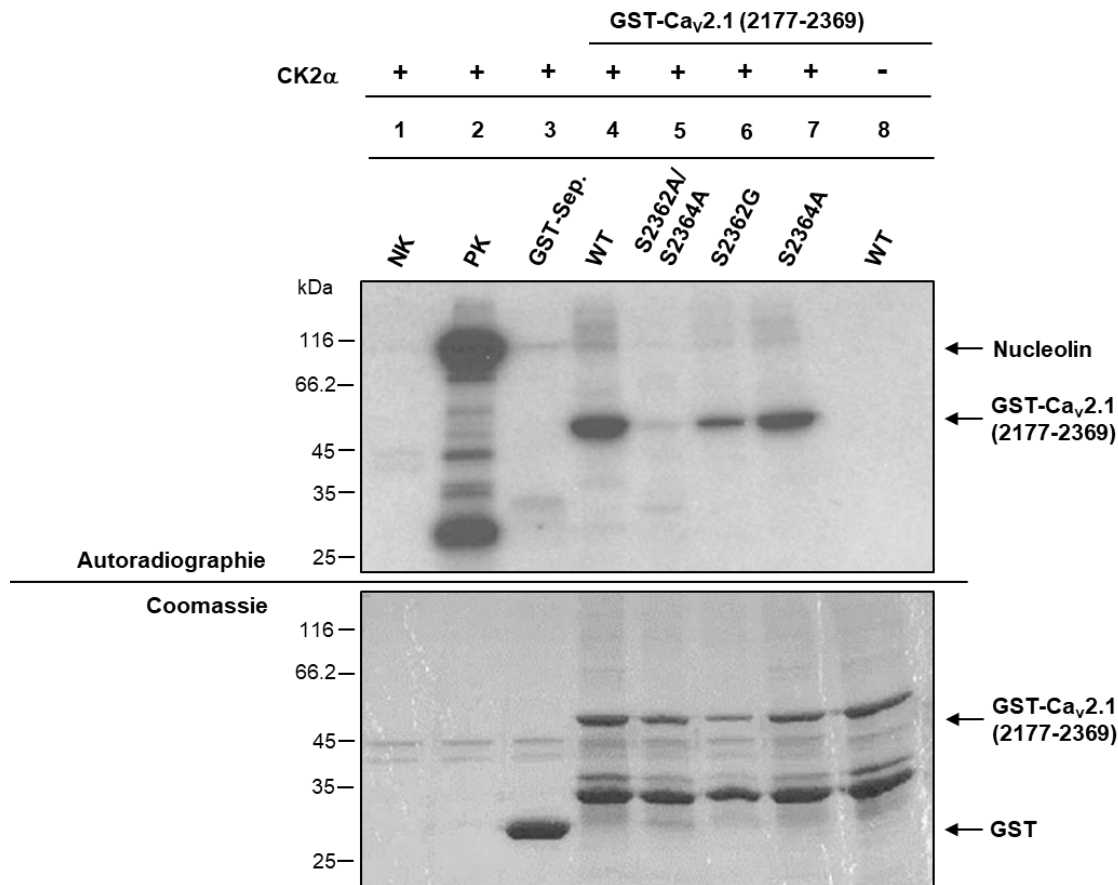
Der *in vitro* CK2-Phosphorylierungsassay für GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369) Wildtyp und die jeweiligen Mutanten (S2362G, S2364A, S2362A/S2364A) ist in der Abbildung 25 dargestellt. Bei einer Zugabe von rekombinanter CK2 ist im Vergleich zur Probe ohne CK2 (Abbildung 25, Spur 8) sowohl beim Wildtyp (Abbildung 25, Spur 4) als auch bei den Einzelmутanten S2362G (Abbildung 25, Spur 6) und S2364A (Abbildung 25, Spur 7) eine Bande bei ca. 47 kDa zu sehen. Bei der Doppelmutante S2363A/S2364A ist diese Bande deutlich schwächer ausgeprägt (Abbildung 25, Spur 5). Dies deutet darauf hin, dass sowohl das Serin an Position 2362 als auch an Position 2364 CK2-Phosphorylierungsstellen in GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369) darstellen. Als Kontrolle diente unter anderem auch an GSH-Sepharose gebundenes GST (Abbildung 25, Spur 3). In der Abbildung 25 (unten) zu sehen ist das zugehörige Coomassie-Blau gefärbte SDS-Polyacrylamidgel.



**Abbildung 25: Nachweis der CK2-Phosphorylierung von GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369) an den Positionen S2362 und S2364.** *In vitro* CK2-Phosphorylierungsassay mit an GSH-Sepharose gebundenem GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369) (10 µl) und gereinigtem CK2-Holoenzym. Nach Zugabe von [<sup>32</sup>P]-γ-ATP (2 µCi) wurden die Proben inkubiert (30 min, 37°C). Auftrennung der phosphorylierten Proteine erfolgte auf einem SDS-Polyacrylamidgel mit anschließender Autoradiographie. Molekulargewichtsmarker: Thermo Scientific™ Pierce™ Prestained Protein Molecular Weight Marker 10-180 kDa. **Oben:** Autoradiographie GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369), Spur 4: Wildtyp mit CK2-Holoenzym, Spur 5: Doppelmutante S2362A/S2364A mit CK2-Holoenzym, Spur 6: S2362G mit CK2-Holoenzym, Spur 7: S2364A mit CK2-Holoenzym, Spur 8: Wildtyp ohne CK2-Holoenzym, NK (Spur 1): Negativkontrolle (Probe ohne Zugabe von GST-Fusionsprotein), PK (Spur 2): Nucleolin, GST-Sep. (Spur 3): GSH-Sep. mit gebundenem GST mit CK2-Holoenzym. **Unten:** Coomassie-Blau Färbung des zugehörigen SDS-Polyacrylamidgels.

Auch hier wurde überprüft, ob eine Phosphorylierung von GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369) allein durch die CK2α-Untereinheit gegeben ist. Abbildung 26 zeigt, dass auch bei einer Zugabe von CK2α beim Wildtyp (Abbildung 26, Spur 4) und den Einzelmутanten S2362G (Abbildung 26, Spur 6) und S2364A (Abbildung 26, Spur 7) eine Bande bei ca. 47 kDa zu sehen ist. Bei der Doppelmutante S2362A/S2364A ist diese auch hier deutlich schwächer ausgeprägt (Abbildung 26, Spur 5). GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369) wird somit an den Positionen S2362 und

S2364 *in vitro* auch von der CK2 $\alpha$ -Untereinheit alleine phosphoryliert. In der Abbildung 26 (unten) ist das zugehörige Coomassie-Blau gefärbte SDS-Polyacrylamidgel zu sehen.



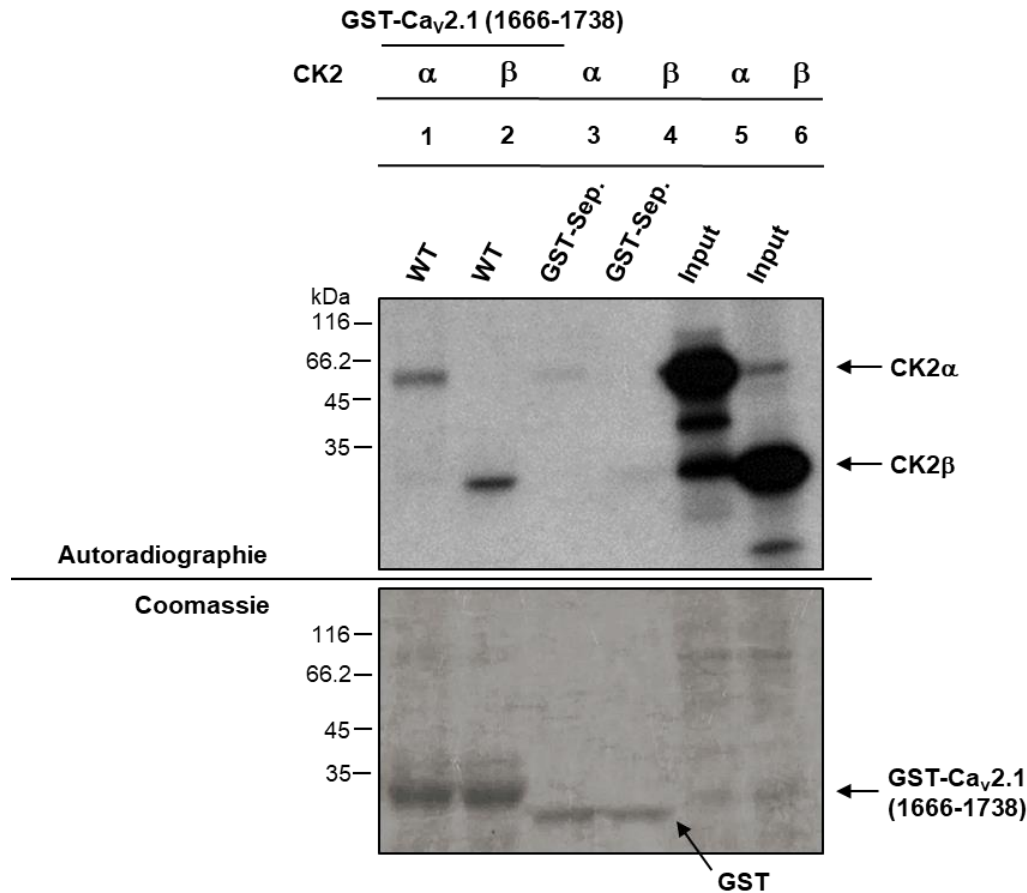
**Abbildung 26: Nachweis der Phosphorylierung von GST-Ca $\gamma$ 2.1 (2177-2369) an den Positionen S2362 und S2364 durch die CK2 $\alpha$ .** *In vitro* CK2-Phosphorylierungsassay mit an GSH-Sepharose gebundenem GST-Ca $\gamma$ 2.1 (2177-2369) (10  $\mu$ l) und gereinigter CK2 $\alpha$ . Nach Zugabe von [ $^{32}$ P]- $\gamma$ -ATP (2  $\mu$ Ci) wurden die Proben inkubiert (30 min, 37°C). Die Auftrennung der phosphorylierten Proteine erfolgte auf einem SDS-Polyacrylamidgel mit anschließender Autoradiographie. Molekulargewichtsmarker: Thermo Scientific™ Pierce™ Unstained Protein Molecular Weight Marker 14.4-116 kDa. **Oben:** Autoradiographie GST-Ca $\gamma$ 2.1 (2177-2369), Spur 4: Wildtyp mit CK2 $\alpha$ , Spur 5: Doppelmutante S2362A/S2364A mit CK2 $\alpha$ , Spur 6: S2362G mit CK2 $\alpha$ , Spur 7: S2364A mit CK2 $\alpha$ , Spur 8: Wildtyp ohne CK2 $\alpha$ , NK (Spur 1): Negativkontrolle (Probe ohne Zugabe von GST-Fusionsprotein), PK (Spur 2): Nucleolin, GST-Sep. (Spur 3): GSH-Sep. mit gebundenem GST mit CK2 $\alpha$ . **Unten:** Coomassie-Blau Färbung des zugehörigen SDS-Polyacrylamidgels.

Die Ergebnisse der Peptidfilterassays (Abbildung 16-18) konnten hiermit bestätigt werden. Bei einer Mutation von S1677 zu Alanin wird das entsprechende Peptid nicht mehr phosphoryliert

(Abbildung 17). Bei den Einzelmutationen S2362A und S2364A findet noch eine Phosphorylierung statt, werden aber beide Stellen mutiert so wird das Peptid nicht mehr phosphoryliert (Abbildung 16 und 17). Das gleiche Bild zeigt sich für die Phosphorylierung durch die CK2 $\alpha$ -Untereinheit. Auch hier konnten die Ergebnisse für S1677 und S2362 bzw. S2364 (Abbildung 18) bestätigt werden. Zusammenfassend konnte verifiziert werden, dass Ca $_v$ 2.1 *in vitro* ein Substrat für die CK2 darstellt. Sowohl S1677 als auch S2362 und S2364 sind als Phosphorylierungsstellen für die CK2 ermittelt worden. Diese werden auch von der CK2 $\alpha$ -Untereinheit allein phosphoryliert.

#### 6.4.4 Untersuchungen der Interaktion der CK2 mit Ca $_v$ 2.1

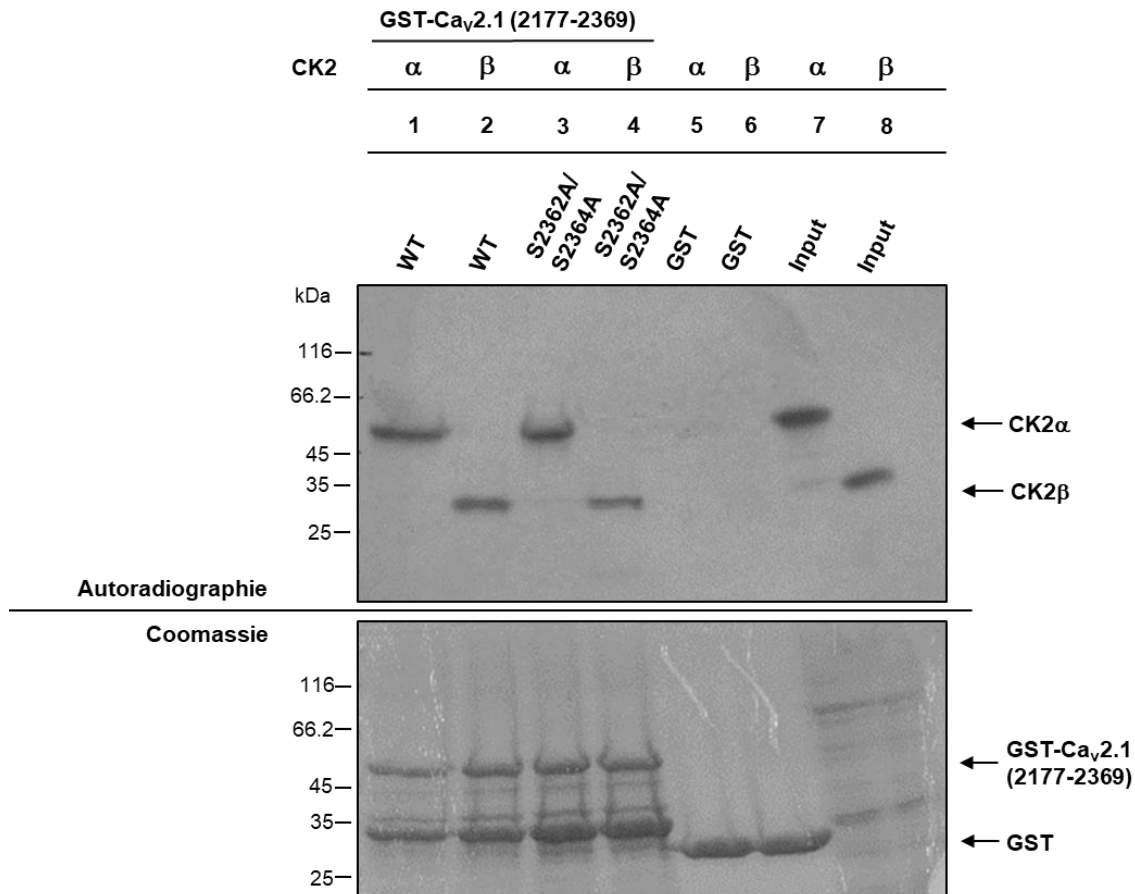
Die Proteinkinase CK2 bindet an ihre Substrate mit ihrer katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit, allerdings werden manche Substrate auch von der  $\beta$ -Untereinheit gebunden [77, 80]. Dies wurde in GST pull-down Assays mit den Fusionsproteinen GST-Ca $_v$ 2.1 (1666-1738) und GST-Ca $_v$ 2.1 (2177-2369) mit Hilfe von [ $^{35}$ S]-Methionin-markierten CK2 $\alpha$ - und CK2 $\beta$ -Untereinheiten untersucht. Als Input Kontrolle diente ein Fünftel des eingesetzten *in vitro* Translationsansatzes. Die Abbildung 27 zeigt das Experiment für GST-Ca $_v$ 2.1 (1666-1738). Sowohl die CK2 $\alpha$ -Untereinheit (Abbildung 27, oben, Spur 1) als auch die CK2 $\beta$ -Untereinheit (Abbildung 27, oben, Spur 2) binden an GST-Ca $_v$ 2.1 (1666-1738).



**Abbildung 27: Interaktion der CK2-Untereinheiten mit GST-Cav2.1 (1666-1738).** Die CK2 $\alpha$ - und CK2 $\beta$ -Untereinheiten wurden mit Hilfe des TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems Kit (Promega) mit [<sup>35</sup>S]-Methionin markiert. Als Template dienten die Plasmide pRSET-A-CK2 $\alpha$  und pRSET-A-CK2 $\beta$ . Für den GST pull-down wurden die radioaktiv markierten CK2-Untereinheiten mit an GSH-Sepharose gebundenem GST-Cav2.1 (1666-1738) (10  $\mu$ l) in PBST (1% Tween 20) gemischt. Nach einer Inkubation über Nacht wurden die Proben mehrmals mit PBST und PBS gewaschen, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel getrocknet und autoradiographisch analysiert. Molekulargewichtsmarker: Thermo Scientific™ Pierce™ Unstained Protein Molecular Weight Marker 14.4-116 kDa. **Oben:** Autoradiographie GST-Cav2.1 (1666-1738). Spur 1: mit CK2 $\alpha$ , Spur 2: mit CK2 $\beta$ , Spur 3: GSH-Sepharose mit gebundenem GST mit CK2 $\alpha$ , Spur 4: GSH-Sepharose mit gebundenem GST mit CK2 $\beta$ , Spur 5: Input *in vitro* Translationsansatz (3  $\mu$ l) mit CK2 $\alpha$ , Spur 6: Input *in vitro* Translationsansatz (3  $\mu$ l) mit CK2 $\beta$ . **Unten:** Coomassie-Blau Färbung des zugehörigen SDS-Polyacrylamidgels.

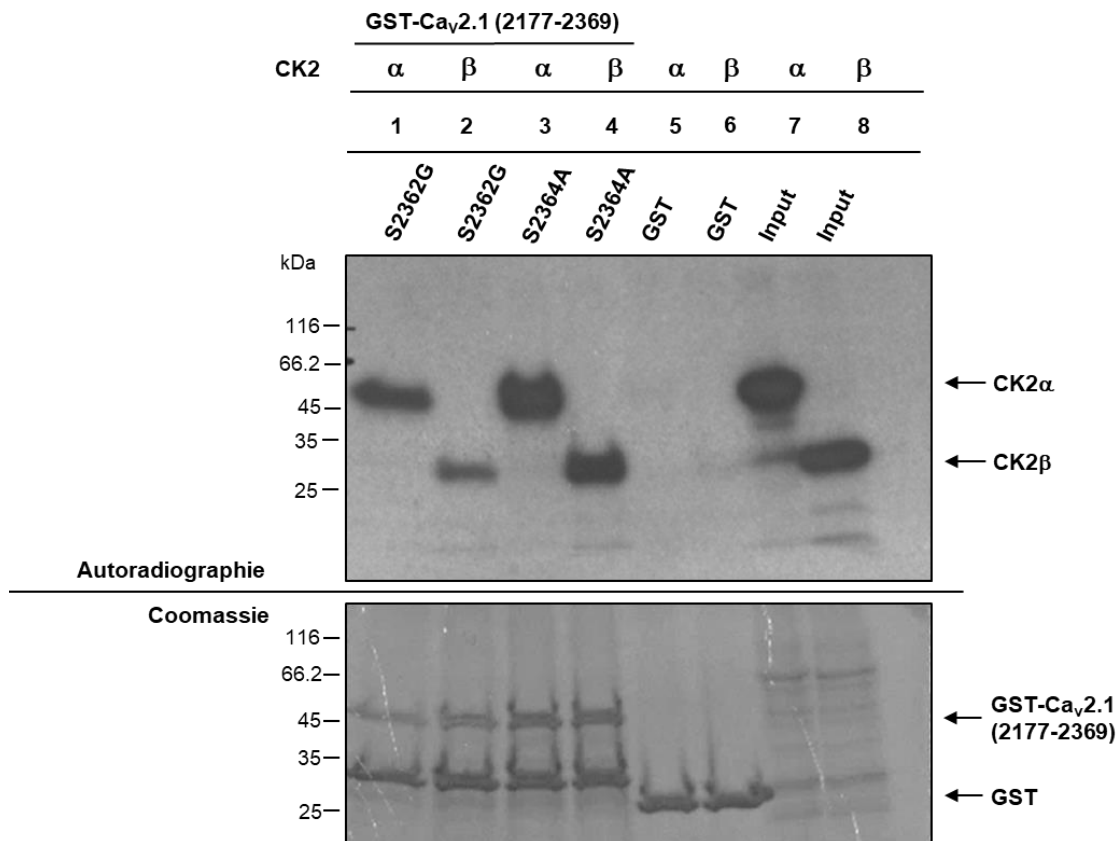
Das Serin an Position 1677 befindet sich in einer extrazellulären Domäne des Ca<sub>v</sub>2.1 Proteins. *In vitro* stellt es eine Phosphorylierungsstelle für die CK2 dar und auch die beiden Untereinheiten CK2 $\alpha$  und CK2 $\beta$  binden *in vitro*. Die Abbildung 28 zeigt den GST pull-down mit GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369) Wildtyp und der GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369) S2362A/S2364A Doppelmutante. Beide Untereinheiten der CK2 (CK2 $\alpha$  und CK2 $\beta$ ) binden sowohl an den

Wildtyp (Abbildung 28, oben, Spur 1 und Spur 2) als auch an die Doppelmutante (Abbildung 28, oben, Spur 3 und Spur 4) und auch in der Bandenstärke ist zwischen Wildtyp und Doppelmutante kein Unterschied zu sehen. Die Bindung hängt demnach nicht von den Serinen an diesen Positionen ab.



**Abbildung 28: Interaktion der CK2-Untereinheiten mit GST-Cav2.1 (2177-2369) Wildtyp und Doppelmutante (S2362A/S2364A).** Die CK2 $\alpha$ - und CK2 $\beta$ -Untereinheiten wurden mit Hilfe des TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems Kit (Promega) mit [<sup>35</sup>S]-Methionin markiert und für den GST pull-down mit an GSH-Sepharose gebundenem GST-Cav2.1 (2177-2369) (10  $\mu$ l) bzw. GST-Cav2.1( 2177-2369) S2362A/S2364A (10  $\mu$ l) in PBST (1% Tween 20) gemischt. Nach einer Inkubation über Nacht wurden die Proben mehrmals mit PBST und PBS gewaschen, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel getrocknet und autoradiographisch analysiert. Molekulargewichtsmarker: Thermo Scientific™ Pierce™ Unstained Protein Molecular Weight Marker 14.4-116 kDa. **Oben:** Autoradiographie GST-Cav2.1 (2177-2369). Spur 1: GST-Cav2.1 (2177-2369) Wildtyp mit CK2 $\alpha$ , Spur 2: GST-Cav2.1 (2177-2369) Wildtyp mit CK2 $\beta$ , Spur 3: GST-Cav2.1 (2177-2369) S2362A/S2364A mit CK2 $\alpha$ , Spur 4: GST-Cav2.1 (2177-2369) S2362A/S2364A mit CK2 $\beta$ , Spur 5: GSH-Sepharose mit gebundenem GST mit CK2 $\alpha$ , Spur 6: GSH-Sepharose mit gebundenem GST mit CK2 $\beta$ , Spur 7: Input *in vitro* Translationsansatz (3  $\mu$ l) mit CK2 $\alpha$ , Spur 8: Input *in vitro* Translationsansatz (3  $\mu$ l) mit CK2 $\beta$ . **Unten:** Coomassie-Blau Färbung des zugehörigen SDS-Polyacrylamidgels.

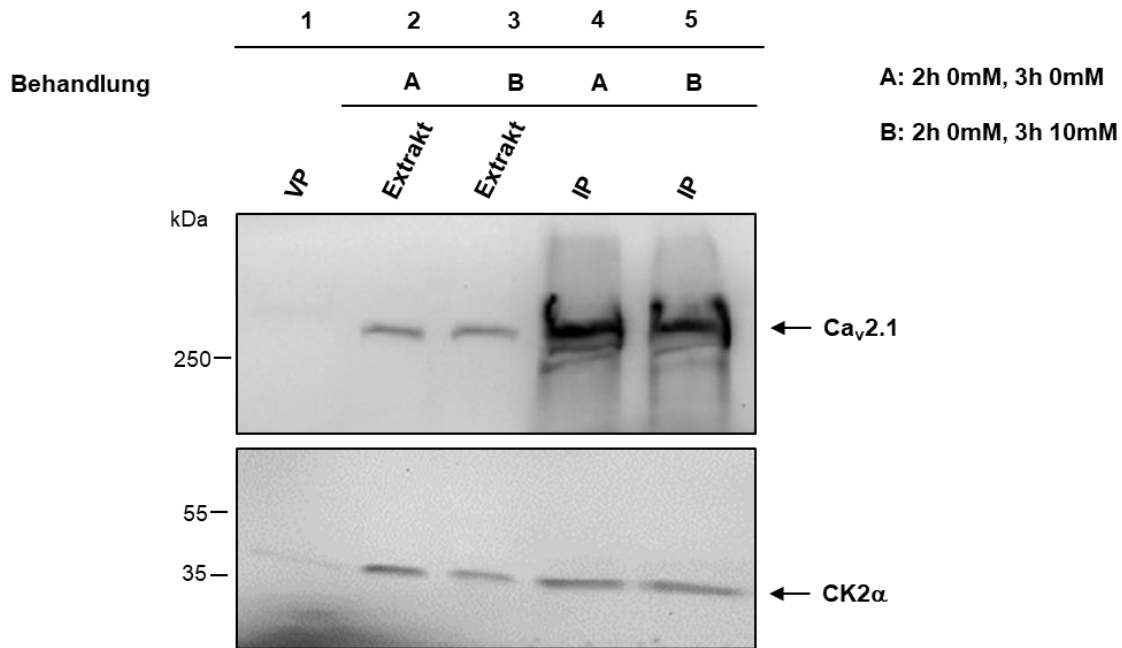
Der GST pull-down wurde auch mit den GST-Ca<sub>v</sub>2.1 (2177-2369) Einzelmутanten S2362G und S2364A durchgeführt (Abbildung 29). Auch hier binden beiden Untereinheiten der CK2 (CK2 $\alpha$  und CK2 $\beta$ ) sowohl an die S2362G Mutante (Abbildung 29, oben, Spuren 1 und 2) als auch an die S2364A Mutante (Abbildung 29, oben, Spuren 3 und 4).



**Abbildung 29: Interaktion der CK2-Untereinheiten mit GST-Cav2.1 (2177-2369) S2362G und S2364A.** Die CK2 $\alpha$ - und CK2 $\beta$ -Untereinheiten wurden mit Hilfe des TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems Kit (Promega) mit [<sup>35</sup>S]-Methionin markiert und für den GST pull-down mit an GSH-Sepharose gebundenem GST-Cav2.1 (2177-2369) S2362G (10  $\mu$ l) bzw. GST-Cav2.1 (2177-2369) S2364A (10  $\mu$ l) in PBST (1% Tween 20) gemischt. Nach einer Inkubation über Nacht wurden die Proben mehrmals mit PBST und PBS gewaschen, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel getrocknet und autoradiographisch analysiert. Molekulargewichtsmarker: Thermo Scientific™ Pierce™ Unstained Protein Molecular Weight Marker 14.4-116 kDa. **Oben:** Autoradiographie GST-Cav2.1 (2177-2369). Spur 1: GST-Cav2.1 (2177-2369) S2362G mit CK2 $\alpha$ , Spur 2: GST-Cav2.1 (2177-2369) S2362G mit CK2 $\beta$ , Spur 3: GST-Cav2.1 (2177-2369) S2364A mit CK2 $\alpha$ , Spur 4: GST-Cav2.1 (2177-2369) S2364A mit CK2 $\beta$ , Spur 5: GSH-Sep. mit gebundenem GST mit CK2 $\alpha$ , Spur 6: GSH-Sep. mit gebundenem GST mit CK2 $\beta$ , Spur 7: Input *in vitro* Translationsansatz (3  $\mu$ l) mit CK2 $\alpha$ , Spur 8: Input *in vitro* Translationsansatz (3  $\mu$ l) mit CK2 $\beta$ . **Unten:** Coomassie-Blau Färbung des zugehörigen SDS-Polyacrylamidgels.

Nachdem die *in vitro* Bindung der CK2-Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  an  $\text{Ca}_v2.1$  gezeigt werden konnte, wurde in einem nächsten Schritt die Bindung der endogenen CK2 an den endogenen  $\text{Ca}_v2.1$  *in vivo* in INS-1 832/13 Zellen untersucht. Dazu wurde eine Coimmunpräzipitation von  $\text{Ca}_v2.1$  mit der CK2 $\alpha$  durchgeführt. In Experimenten der Arbeitsgruppe Montenarh konnte zuvor gezeigt werden, dass Glucose einen Einfluss auf die Bindung der CK2 an Substrate hat [121]. Deshalb wurde gleichzeitig überprüft, ob Glucose (0 mM im Vergleich zu 10 mM) einen Einfluss auf eine mögliche Substratbindung hat. Die Immundetektion erfolgte sowohl mit dem  $\text{Ca}_v2.1$  Antikörper als auch mit einem Antikörper gegen die CK2 $\alpha$ . Als Kontrolle diente eine Kontrollpräzipitation des Extraktes mit der Sepharose. Wie in der Abbildung 30 zu sehen ist, konnte der  $\text{Ca}_v2.1$ -Kanal erfolgreich präzipitiert werden (Spuren 4 und 5 IP, ~280 kDa). Die CK2 $\alpha$ -Untereinheit konnte ebenfalls copräzipitiert werden (Spuren 4 und 5 IP, ~42 kDa). Die CK2 $\alpha$ -Untereinheit scheint somit *in vivo* mit dem  $\text{Ca}_v2.1$  Protein zu interagieren. Ein Unterschied in der Interaktion bei einer Behandlung mit 0 mM Glucose (Behandlung A) bzw. 10 mM Glucose (Behandlung B) konnte nicht festgestellt werden. Die Präzipitationskontrolle zeigt keine Bande bei  $\text{Ca}_v2.1$  (~280 kDa) und nur eine sehr schwache Bande auf Höhe der CK2 $\alpha$ -Untereinheit (~42 kDa) (Spur 1). Die Interaktion des  $\text{Ca}_v2.1$  Proteins findet somit ausschließlich mit der CK2 $\alpha$  statt. Die CK2 $\alpha$ -Untereinheit scheint teilweise auch an der Protein-G-Sepharose zu binden, die Bande der Immunpräzipitation (Spuren 4 und 5 IP) ist aber deutlich stärker. Als eine weitere Kontrolle wurden 1.6% der für die IP eingesetzten Extrakte aufgetragen.



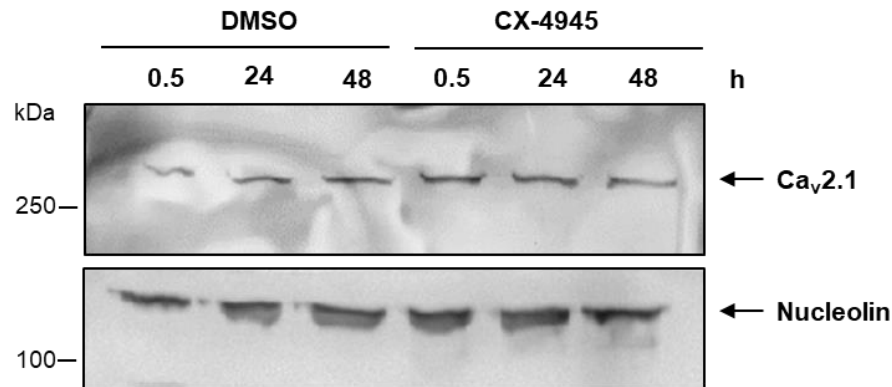
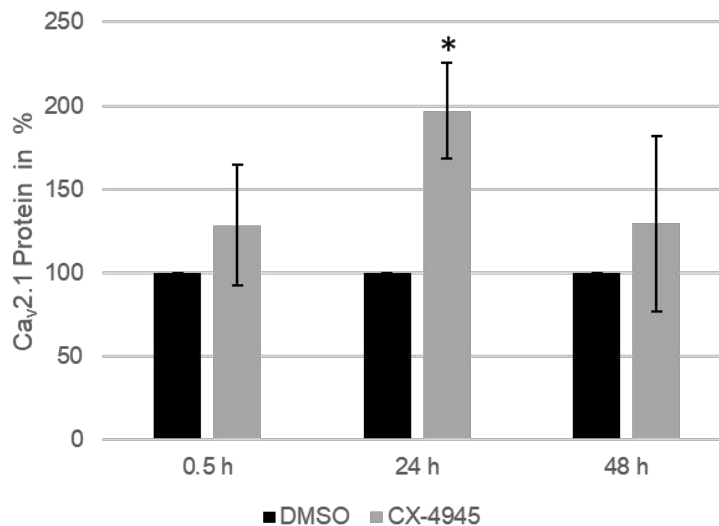


**Abbildung 30: Interaktion der endogenen CK2 mit dem endogenen Ca<sub>v</sub>2.1-Kanals unter dem Einfluss von verschiedenen Glucosekonzentrationen.** INS-1 832/13 Zellen wurden für 2 h gehungert (RPMI -Glu) und anschließend für 3 h in RPMI mit 0 mM (Behandlung A) oder 10 mM Glucose (Behandlung B) inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und mit Lysepuffer aufgeschlossen. Der Gesamtproteingehalt wurde mittels Bradford-Assay ermittelt. Extrakt (5 mg) wurde mit Protein-G-Sepharose (gepackt 30 µl), gekoppelt mit Ca<sub>v</sub>2.1 Antikörper (Abcam ab181371) über Nacht inkubiert (4°C). Danach wurden die Proben mit PBS gewaschen, die Sepharose mit 3x SDS-Probenpuffer versetzt (30 µl), die Proben gekocht (95°C, 5 min) und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden dann auf eine PVDF-Membran geblottet. Diese wurde geteilt und zum einen mit einem spezifischen Antikörper gegen Ca<sub>v</sub>2.1 (Abcam ab181371) bzw. gegen CK2α (1A5) behandelt. VP (Spur 1): Kontrollpräzipitation mit Sepharose (2 h, 4°C, 30 µl), Extrakt (Spuren 2 und 3): für die Immunpräzipitation eingesetzter Extrakt (80 µg), IP (Spuren 4 und 5): Immunpräzipitation (30 µl). Molekulargewichtsmarker: ThermoFisher™ PageRuler™ Plus Prestained 10-250 kDa.

Damit konnte nachgewiesen werden, dass die CK2α-Untereinheit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit dem Ca<sub>v</sub>2.1 Protein interagiert. Wie zuvor gezeigt wurde wird die Insulinsekretion (Abbildung 9) sowie die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Ionenkonzentration (Abbildung 11) durch eine Hemmung der CK2 gesteigert. Von weiterem Interesse war es nun herauszufinden, auf welchem Weg die Beeinflussung durch die CK2-Inhibition stattfindet. Hierzu wurde eine Steigerung der Proteinexpression des endogenen Ca<sub>v</sub>2.1 Proteins, nach Inhibition der CK2 als Ursache für die Erhöhung des Ca<sup>2+</sup>-Influxes in Betracht gezogen.

#### **6.4.5 Untersuchungen der endogenen Ca<sub>v</sub>2.1 Proteinexpression nach CK2-Inhibition**

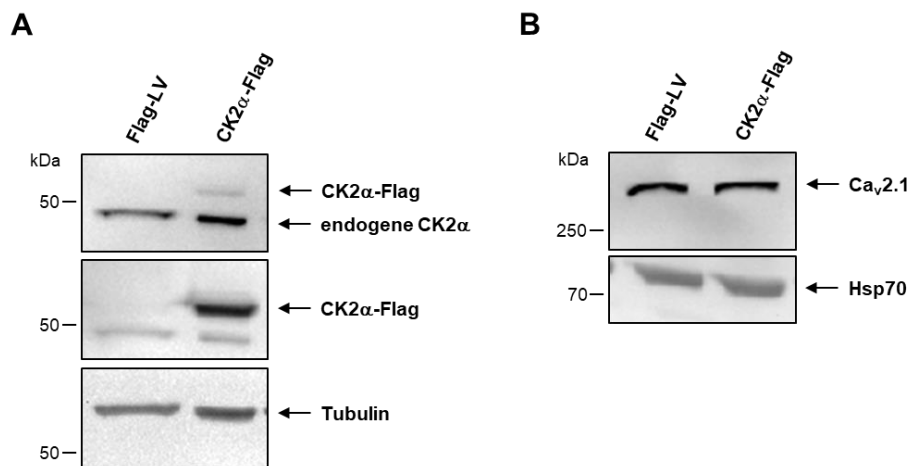
Zur Untersuchung der Ca<sub>v</sub>2.1 Proteinexpression nach einer Inhibition der Kinaseaktivität der CK2 wurden INS-1 832/13 Zellen mit dem CK2 Inhibitor CX-4945 unterschiedlich lange behandelt (0.5 h, 24 h, 48 h). Die lebenden Zellen wurden geerntet, aufgeschlossen und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Auftrennung erfolgte eine Western Blot Analyse und Immundetektion mit einem Antikörper gegen Ca<sub>v</sub>2.1 (Abcam ab181371). Als Ladekontrolle diente Nucleolin. Die Proteinbanden wurden anschließend quantifiziert. Die Abbildung 31 A zeigt exemplarisch einen Western Blot nach Immundetektion. Nach einer Normierung auf die Ladekontrolle und Quantifizierung der Proteinbanden (Abbildung 31 B) zeigt sich, dass der Ca<sub>v</sub>2.1 Proteingehalt nach einer Behandlung der Zellen mit CX-4945 erhöht ist. Insbesondere nach einer 24 Stunden Behandlung mit CX-4945 ist die Ca<sub>v</sub>2.1 Proteinexpression um fast das Doppelte signifikant erhöht. Nach 48 Stunden ist der Wert wieder gesunken, aber verglichen zur Kontrolle weiterhin erhöht.

**A****B**

**Abbildung 31: Auswirkungen einer Inhibition der CK2 auf die Cav2.1 Proteinexpression in INS-1 832/13 Zellen.** INS-1 832/13 Zellen wurden mit DMSO oder CX-4945 (10 μM) behandelt (30 min, 24 h und 48 h). Die Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und mit Lysepuffer aufgeschlossen. Der Gesamtproteingehalt wurde mittels Bradford-Assay ermittelt, die Proben gekocht (95°C, 5 min) und die Proteine (80 μg) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden dann auf eine PVDF-Membran geblottet. Das Cav2.1 Protein wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers detektiert (abcam ab181371) **A:** Western Blot Analyse des Cav2.1 (~280 kDa). Ladekontrolle: Nucleolin. Molekulargewichtsmarker: ThermoFisher™ PageRuler™ Plus Prestained 10-250 kDa. **B:** Quantifizierung der Cav2.1 Protein Banden. Die Proben wurden gegen die Ladekontrolle (Nucleolin) normiert Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM von vier unabhängigen Experimenten, \*P < 0.05.

Das Ergebnis (Abbildung 31) deutet darauf hin, dass eine Hemmung der CK2 eine Erhöhung der Cav2.1 Proteinexpression zu Folge hat. Zwar wurden für die Experimente nur die lebenden Zellen verwendet, allerdings sollte man in Erinnerung behalten, dass nach 24 Stunden CK2-Hemmung eine deutliche Apoptose-Induktion stattfindet (Abbildung 8) und diese auch in den lebenden Zellen bereits induziert sein könnte. In einem weiteren Experiment wurde

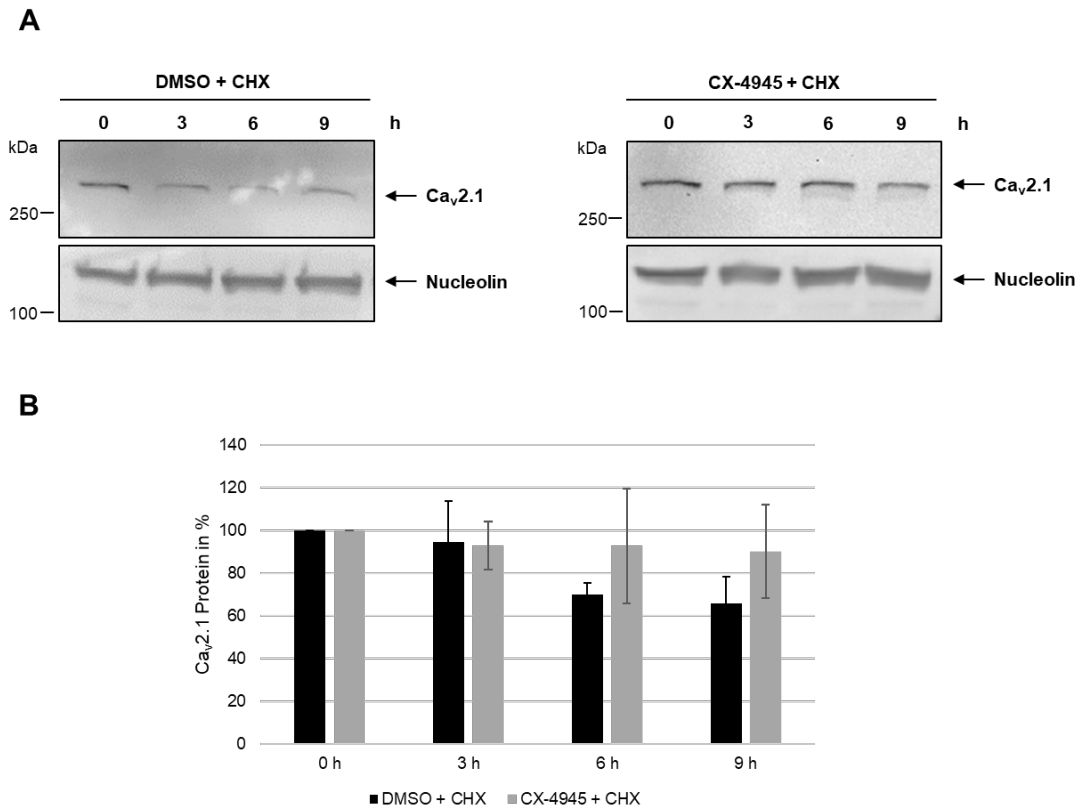
überprüft, ob im Umkehrschluss eine CK2 $\alpha$  Überexpression eine Senkung des Ca $_v$ 2.1 Proteinlevels zur Folge hat. Dazu wurden INS-1 832/13 Zellen mit 3xFLAG-CMV-CK2 $\alpha$  transfiziert. Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE erfolgte eine Western Blot Analyse und Immundetektion. Zunächst wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen die CK2 $\alpha$ -Untereinheit überprüft, ob die Transfektion erfolgreich war (Abbildung 32 A). In beiden Spuren konnte die endogene CK2 $\alpha$  detektiert werden. In der Spur der CK2 $\alpha$ -Flag Transfektion ist eine zusätzliche Bande zu sehen, welche der CK2 $\alpha$  des Vektorkonstruktes entspricht. Anschließend wurde die gleiche Blotmembran mit einem Antikörper gegen den Flag-Tag behandelt. Auch hier kann eine Bande für das CK2 $\alpha$ -Flag Konstrukt detektiert werden. Die Bande entspricht der zuvor mit dem CK2 $\alpha$  Antikörper detektierten Bande und ist in der Flag-Leervektor Spur nicht zu sehen. Das CK2 $\alpha$ -Flag Konstrukt konnte mit beiden Antikörpern nachgewiesen und die Transfektion somit als erfolgreich betrachtet werden. Die Proben wurden ebenfalls hinsichtlich des Ca $_v$ 2.1 Proteingehalts untersucht (Abbildung 32 B). Zwischen einer Transfektion mit dem Flag-Leervektor und einer Transfektion mit dem CK2 $\alpha$ -Flag Konstrukt ist kein Unterschied in der Bandenstärke für das Ca $_v$ 2.1 Protein zu sehen.



**Abbildung 32: Untersuchung der Ca $_v$ 2.1 Proteinexpression nach CK2 $\alpha$ -Überexpression in INS-1 832/13 Zellen.** INS-1 832/13 Zellen wurden mit 3xFLAG-CMV-7.1 oder 3xFLAG-CMV-CK2 $\alpha$  (4  $\mu$ g) transfiziert (6-well, TurboFect 6  $\mu$ l, 48 h), die Zellen geerntet mit PBS gewaschen und mit Lysepuffer aufgeschlossen. Der Gesamtproteingehalt wurde mittels Bradford-Assay ermittelt, die Proben gekocht (95°C, 5 min) und die Proteine (80  $\mu$ g) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden dann auf eine PVDF-Membran geblottet. Für die Immunodetektionen wurden jeweils die gleichen Extrakte verwendet. **A:** Immunodetektion der CK2 $\alpha$  (oben, ~42 kDa) und des CK2 $\alpha$ -Flag Konstruktes (Mitte, ~45 kDa). Tubulin diente als Ladekontrolle (~55 kDa). Molekulargewichtsmarker: Thermo Scientific™ Pierce™ Prestained Protein Molecular Weight Marker 20-120 kDa. **B** Immunodetektion des Ca $_v$ 2.1 (~280 kDa). HSP70 diente als Ladekontrolle (~70 kDa). Molekulargewichtsmarker:

ThermoFisher™ PageRuler™ Plus Prestained 10-250 kDa.

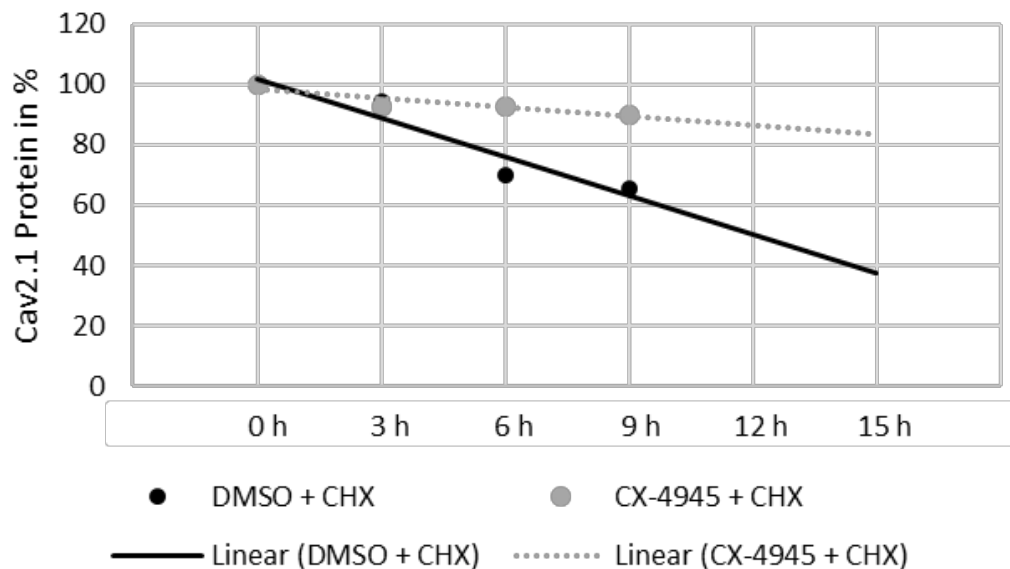
Mit diesem Experiment konnte somit nicht im Umkehrschluss gezeigt werden, dass eine Überexpression der CK2 $\alpha$  eine Erniedrigung der Ca<sub>v</sub>2.1 Proteinexpression zur Folge hat. In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die gezeigte Erhöhung des Ca<sub>v</sub>2.1 Proteingehalts nach einer Inhibition durch CK2 (Abbildung 31) durch eine veränderte Protein Stabilität zu erklären ist. Dies konnte für andere Substrate der CK2 gezeigt werden [119, 154]. Dazu wurde die Proteinbiosynthese durch Cycloheximid (CHX) inhibiert. Die INS-1832/13 Zellen wurden mit dem CK2 Inhibitor CX-4945 und mit CHX unterschiedlich lange behandelt (0 h, 3 h, 6 h, 9 h). Über den Zeitpunkt von neun Stunden hinaus waren keine lebenden Zellen mehr vorhanden und das Experiment wurde somit abgebrochen. Auch bei diesem Versuch muss bedacht werden, dass nach 24 Stunden CK2-Hemmung eine Apoptose-Induktion stattfindet (Abbildung 8). Die Proben wurden mittels Western Blot und Immundetektion mit einem Antikörper gegen Ca<sub>v</sub>2.1 untersucht. Als Ladekontrolle diente Nucleolin. Die Proteinbanden wurden anschließend quantifiziert. In der Abbildung 33 sind exemplarisch Western Blots und die Quantifizierung der Proteinbanden aus vier unabhängigen Experimenten dargestellt.



**Abbildung 33: Auswirkungen einer gleichzeitigen Inhibition der CK2 und der Proteinbiosynthese auf die Cav2.1 Proteinexpression in INS-1 832/13 Zellen.** INS-1 832/13 Zellen wurden mit CX-4945 (10  $\mu$ M) und CHX (100  $\mu$ g/ml) behandelt. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 3 h, 6 h, 9 h) geerntet, mit PBS gewaschen und mit Lysepuffer aufgeschlossen. Der Gesamtproteingehalt wurde mittels Bradford-Assays ermittelt, die Proben gekocht (95°C, 5 min) und die Proteine (80  $\mu$ g) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden dann auf eine PVDF-Membran geblottet. Cav2.1 wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers detektiert (abcam ab181371). Als Ladekontrolle diente Nucleolin. **A:** Immunodetektion von Cav2.1. Molekulargewichtsmarker: ThermoFisher™ PageRuler™ Plus Prestained 10-250 kDa. **Links:** Behandlung der Zellen mit CHX (100  $\mu$ g/ml) und DMSO als Lösemittelkontrolle. **Rechts:** Behandlung der Zellen mit CX-4945 (10  $\mu$ M) und CHX (100  $\mu$ g/ml). **B:** Gezeigt ist die Quantifizierung der Cav2.1 Protein Banden. Die Proben wurden gegen die Ladekontrolle (Nucleolin) normiert. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM von vier unabhängigen Experimenten.

Die Intensität der Cav2.1 Proteinbande nimmt bei einer Inhibition der Proteinbiosynthese über neun Stunden deutlich ab (Abbildung 33 A, links). Wird gleichzeitig die CK2 inhibiert so ist diese Abnahme nicht zu sehen (Abbildung 33 A, rechts). Durch die Quantifizierung (Abbildung 33 B) wird deutlich, dass der Proteingehalt von Cav2.1 nach einer alleinigen Hemmung der Proteinbiosynthese mit CHX deutlich schneller als bei einer gleichzeitigen Inhibition der CK2 sinkt. Nach 9 Stunden liegt der Cav2.1 Proteingehalt der Kontrollbehandlung mit DMSO und CHX bei ca. 65%. Bei den mit CX-4945 behandelten Zellen liegt er bei ca. 90%. Die fehlende CK2-Phosphorylierung scheint das Cav2.1 Protein vor dem Abbau zu schützen. Die Halbwertszeit des Cav2.1 konnte in den INS-1 832/13 Zellen, aufgrund Ihrer schlechten Verträglichkeit von CHX nicht bestimmt werden. Die Abbildung 34 zeigt daher die Extrapolation

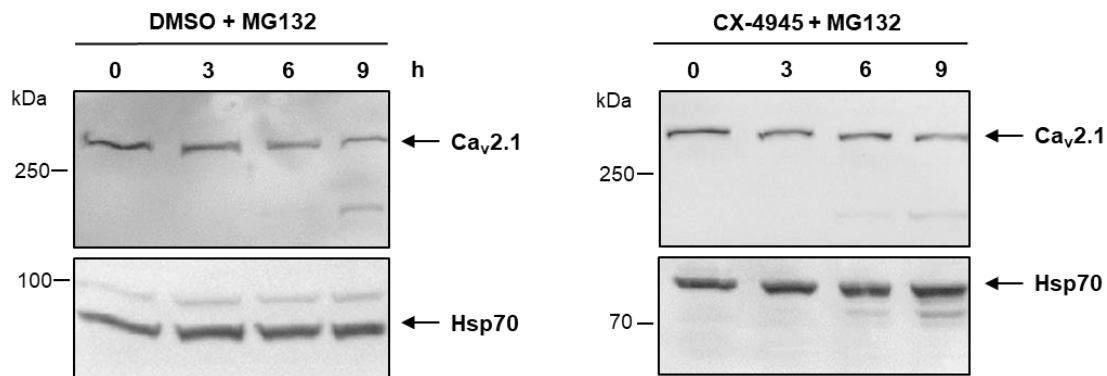
für die Halbwertszeit von  $\text{Ca}_v2.1$  in INS-1 832/13 Zellen.



**Abbildung 34: Extrapolation für die Halbwertszeit von  $\text{Ca}_v2.1$  in INS-1 832/13 Zellen.** Die auf die Ladekontrolle (Nucleolin) normierten Werte für das  $\text{Ca}_v2.1$  Protein nach einer Behandlung mit CHX (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , schwarz) bzw. gleichzeitiger Behandlung mit CX-4945 (10  $\mu\text{M}$ , grau) (s. Abbildung 33) wurden zur Bestimmung der Halbwertszeit von  $\text{Ca}_v2.1$  mit Hilfe von Excel extrapoliert.

Durch die Extrapolation (Abbildung 34) ergibt sich eine Halbwertszeit von ca. 12 Stunden für  $\text{Ca}_v2.1$  (schwarz) in den INS-1 Zellen. Bei einer gleichzeitigen Hemmung der CK2 ist diese deutlich erhöht (grau). Die Erhöhung des  $\text{Ca}_v2.1$  Proteinlevels nach einer CK2 Inhibition könnte somit möglicherweise durch die erhöhte Stabilität des Proteins bedingt sein. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass das Ubiquitin-Proteasom System die Oberflächenexpression von  $\text{Ca}_v2.1$  kontrolliert [155]. Als nächstes wurde daher untersucht, ob eine Inhibition der CK2 möglicherweise auch einen Einfluss auf die Degradation des  $\text{Ca}_v2.1$  Proteins hat. Dazu wurden INS-1 832/13 Zellen mit dem CK2-Inhibitor CX-4945 sowie mit einem Proteasom-Inhibitor MG132 unterschiedlich lange behandelt (0 h, 3 h, 6 h, 9 h). Es erfolgte eine Western Blot Analyse und Immundetektion der Proben mit einem Antikörper gegen  $\text{Ca}_v2.1$ . Als Ladekontrolle diente HSP70. Auch hier waren über den Zeitpunkt von neun Stunden hinaus keine lebenden Zellen mehr vorhanden und das Experiment wurde abgebrochen. Nach einer Hemmung des Proteasoms bleibt der  $\text{Ca}_v2.1$  Proteingehalt

unverändert (Abbildung 35, links). Ein Unterschied bei einer gleichzeitigen Inhibition der CK2 ist nicht erkennbar (Abbildung 35, rechts).



**Abbildung 35: Auswirkungen einer gleichzeitigen Inhibition der CK2 und des Proteasoms auf den Cav2.1 Proteingehalt in INS-1 832/13 Zellen.** INS-1 832/13 Zellen wurden mit CX-4945 (10  $\mu$ M) und MG132 (5  $\mu$ M) behandelt. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 3 h, 6 h, 9 h) geerntet, mit PBS gewaschen und mit Lysepuffer aufgeschlossen. Der Gesamtproteingehalt wurde mittels Bradford-Assay ermittelt, die Proben gekocht (95°C, 5 min) und die Proteine (80  $\mu$ g) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden dann auf eine PVDF-Membran geblottet. Cav2.1 wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers detektiert (abcam ab181371). Als Ladekontrolle diente HSP70. Molekulargewichtsmarker: ThermoFisher™ PageRuler™ Plus Prestained 10-250 kDa.

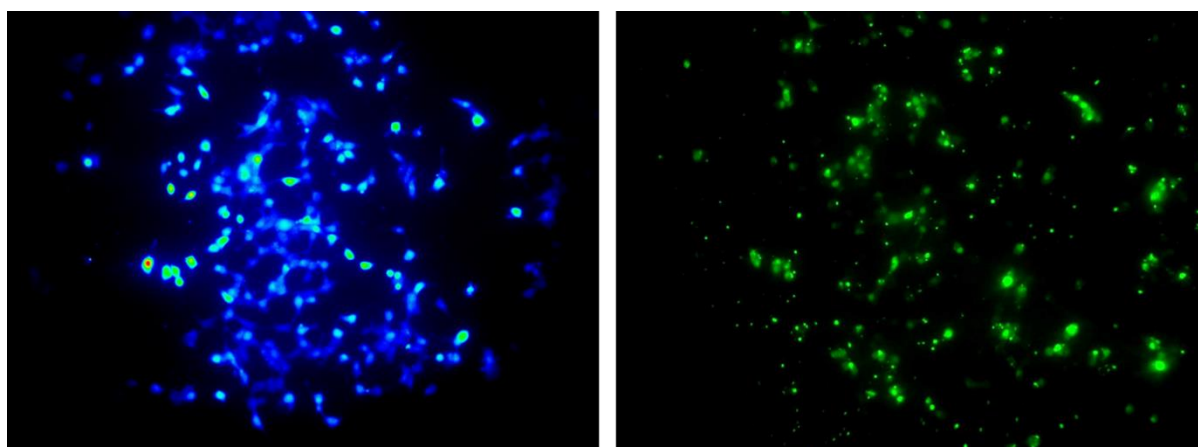
Es konnte nicht gezeigt werden, dass die Phosphorylierung durch die CK2 einen Einfluss auf die Proteinbiosynthese des Cav2.1 Proteins hat bzw. in Bezug zu dem Ubiquitin-Proteasom System steht. Um eine direkte Beteiligung des Cav2.1 Kanals an der Steigerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration nach CK2-Inhibition nachzuweisen, wurde im nächsten Schritt die Cav2.1 Proteinexpression mit Hilfe von siRNA-Experimenten ausgeschaltet. Im Anschluss daran wurde die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration nach Hemmung der CK2 bestimmt.

## 6.5 Analyse der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration nach Cav2.1 „knockdown“ und Inhibition der CK2

Zum Nachweis, dass der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration nach CK2 Inhibition



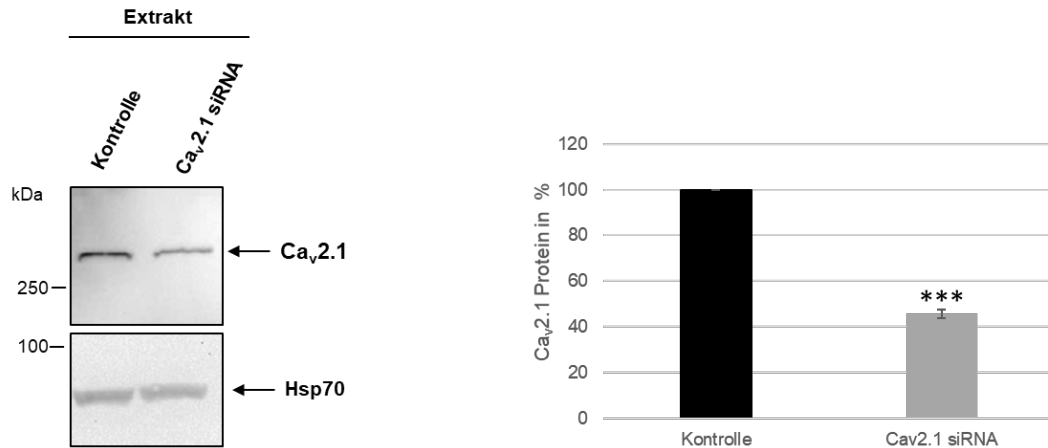
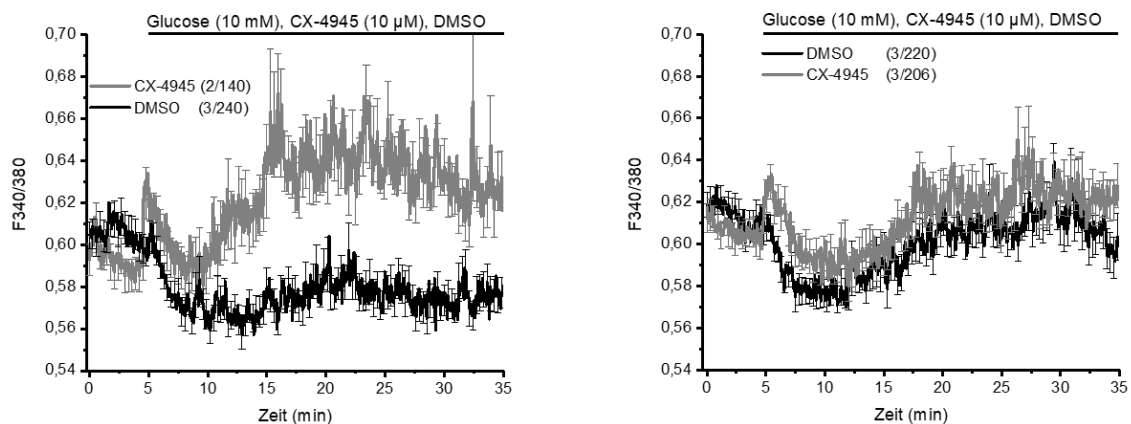
in INS-1 832/13 Zellen auf den  $\text{Ca}_v2.1$ -Kanal zurückzuführen ist, wurde dieser durch siRNA herunter reguliert. Die  $\text{Ca}_v2.1$  „knockdown“ Zellen wurden zur Inhibition der CK2 mit CX-4945 behandelt und anschließend wurde die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration gemessen. Zur Identifizierung der transfizierten Zellen wurde gleichzeitig ein Transfektionsindikator (siGLO) transfiziert. Die Messung der intrazellulären Calciumionenkonzentration durch Fluoreszenzänderung erfolgte mittels Fura 2-AM ( $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator) und wurde anhand des Verhältnisses der emittierten Lichtmenge bei Anregung mit 340 nm und 380 nm bestimmt. Abbildung 36 zeigt die Gesamtheit der INS-1 832/13 Zellen im Vergleich zu den transfizierten Zellen. Bei einer Anregung mit 340/380 nm sind alle mit Fura 2-AM beladenen Zellen zu sehen (Abbildung 36, links). Bei einem Wechsel zu 494 nm sind nur die Zellen zu sehen, die sowohl die siRNA als auch den siGLO Green Transfection Indicator aufgenommen haben (Abbildung 36, rechts). Somit können für die Auswertung der Fluoreszenzsignale ausschließlich die transfizierten Zellen gewählt werden.



**Abbildung 36: Vergleich Gesamtheit der INS-1 Zellen mit transfizierten INS-1 832/13 Zellen.** INS-1 832/13 Zellen wurden mit Kontroll siRNA (200 nM, Dharmacon, D-001810-10-05) oder  $\text{Ca}_v2.1$  siRNA (200 nM, Dharmacon, L-090177-02-0005) transfiziert (6-well, 48 h, 10  $\mu\text{l}$ ). Gleichzeitig wurden die Zellen mit siGLO Green Transfection Indicator (200 nM, Dharmacon, D-001630-01) transfiziert. **Links:** Aufnahme bei Anregung bei 340/380 nm für die Fura 2-AM Messung. Zu sehen sind alle Zellen. **Rechts:** Aufnahme bei Anregung mit 494 nm. Zu sehen sind nur die transfizierten Zellen.

Der „knockdown“ des  $\text{Ca}_v2.1$  ist in der Abbildung 37 A gezeigt. Links ist exemplarisch eine Western Blot Analyse von transfizierten Extrakten zu sehen. Im Vergleich zu einer Transfektion mit Kontroll siRNA ist eine schwächere Bande für das  $\text{Ca}_v2.1$  Protein in der „knockdown“ Transfektionsprobe zu sehen. Die Quantifizierung der Proteinbanden (Abbildung 37 A, rechts)

zeigt, dass der  $\text{Ca}_v2.1$  Proteingehalt nach einer  $\text{Ca}_v2.1$  siRNA Transfektion signifikant um ca. 55% reduziert ist. Das  $\text{Ca}_v2.1$  Protein konnte somit herunter reguliert werden. Die Messung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Transfektion mit  $\text{Ca}_v2.1$  siRNA und CK2 Inhibition ist in der Abbildung 37 B gezeigt. Links ist die Messung mit der Kontroll siRNA zu sehen. Auch hier zeigt sich nach einer Inhibition der CK2 mit CX-4945 (graue Linie) eine deutliche Steigerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration. Dieser Effekt ist bei einem „knockdown“ des  $\text{Ca}_v2.1$  nicht zu sehen (Abbildung 37 B, rechts). Dies zeigt, dass durch die Hemmung ein negativ regulatorischer Effekt der CK2 auf  $\text{Ca}_v2.1$  unterbunden wird. Der  $\text{Ca}_v2.1$  Kanal ist für die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration nach CK2-Hemmung verantwortlich und die fehlende CK2-Phosphorylierung von  $\text{Ca}_v2.1$  scheint an diesem Prozess beteiligt zu sein.

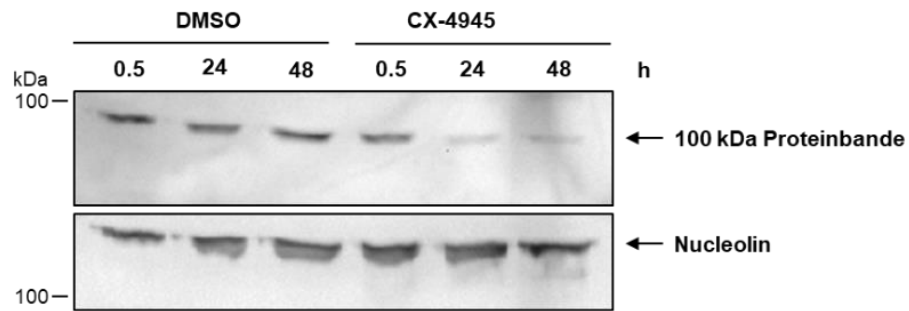
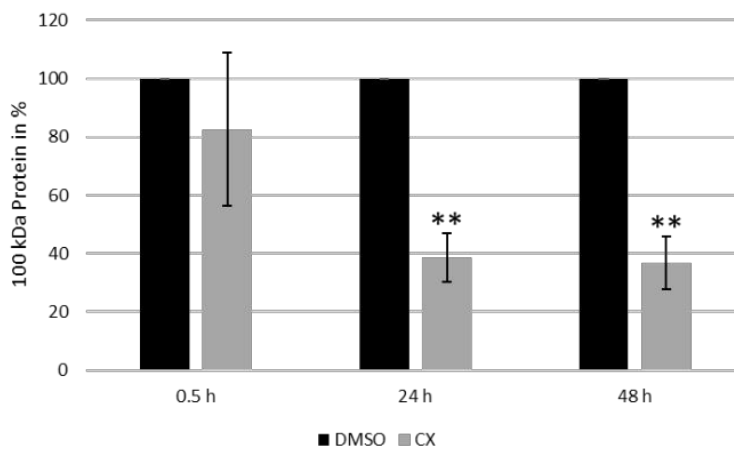
**A****B**

**Abbildung 37: Intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration nach Cav2.1 „knockdown“ und Inhibition der CK2 in INS-1 832/13 Zellen.** INS-1 832/13 Zellen wurden mit Kontroll siRNA (200 nM, Dharmacon, D-001810-10-05) oder Cav2.1 siRNA (200 nM, Dharmacon, L-090177-02-0005) transfiziert (6-well, 48 h, 10 µl). Gleichzeitig wurden die Zellen mit siGLO Green Transfection Indicator (200 nM, Dharmacon, D-001630-01) transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen für 2 h gehungert (RPMI, -Glu) und für 30 min inkubiert (KRBH -Glu) bei gleichzeitiger Beladung mit Fura 2-AM (Endkonz.: 5 ng/µl). Die Messung wurde in KRBH -Glu gestartet. Nach 5 min wurden die Zellen mit CX-4945 (10 µM) behandelt bei gleichzeitiger Stimulation mit Glucose (10 mM). DMSO diente als Lösemittelkontrolle. **A: Links:** Western Blot Analyse der transfizierten Zellextrakte. Cav2.1 wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers detektiert (abcam ab181371, ~280 kDa). Als Ladekontrolle diente HSP70. Molekulargewichtsmarker: ThermoFisher™ PageRuler™ Plus Prestained 10-250 kDa. **Rechts:** Quantifizierung der Cav2.1 Protein Bande. Die Proben wurden gegen die Ladekontrolle normiert. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten, \*\*\* $P$  = 0.001. **B: Links:** Verlauf der intrazellulären Calciumkonzentration nach Transfektion mit Kontroll siRNA (200 nM, Dharmacon, D-001810-10-05) und Behandlung mit CX-4945 mit insgesamt 140 Zellen aus 2 unabhängigen Experimenten ( $n=2/140$ , 10 µM, graue Linie). DMSO als Kontrolle mit insgesamt 240 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten ( $n=3/240$ , schwarze Linie). Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM von zwei (CX-4945) bzw. drei (DMSO) unabhängigen Experimenten. **Rechts:** Verlauf der intrazellulären Calciumkonzentration nach Transfektion mit Cav2.1 siRNA (200 nM, Dharmacon, L-090177-02-0005) und Behandlung mit CX-4945 mit insgesamt 206 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten ( $n=3/206$ , 10 µM, graue Linie). DMSO als Kontrolle mit insgesamt 220 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten ( $n=3/220$ , schwarze Linie). Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl die Insulinsekretion als auch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration in INS-1 832/13 Zellen nach einer Inhibition der CK2 signifikant erhöht ist. Für die Insulinsekretion konnte dies auch in murinen Langerhans-Inseln gezeigt werden. Durch *in vitro* Analysen konnten S1677, S2362 und S2364 als Phosphorylierungsstellen für die CK2 ermittelt werden und somit gezeigt werden, dass der  $\text{Ca}_v2.1$  Kanal *in vitro* ein Substrat für die CK2 darstellt. Die CK2-Phosphorylierung des endogenen  $\text{Ca}_v2.1$  Kanals gab einen deutlichen Hinweis auf eine *in vivo* Phosphorylierung und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte eine Bindung der CK2 an den  $\text{Ca}_v2.1$  nachgewiesen werden. Weiterhin wird das  $\text{Ca}_v2.1$  Protein durch eine CK2-Inhibition stabilisiert. Außerdem konnte durch die Hemmung der CK2 ein negativ regulatorischer Effekt der CK2 auf den  $\text{Ca}_v2.1$ -Kanal und den durch ihn gesteuerten Calcium Influx gezeigt werden.

## 6.6 Exkurs: Untersuchungen einer Proteinbande bei ca. 100 kDa

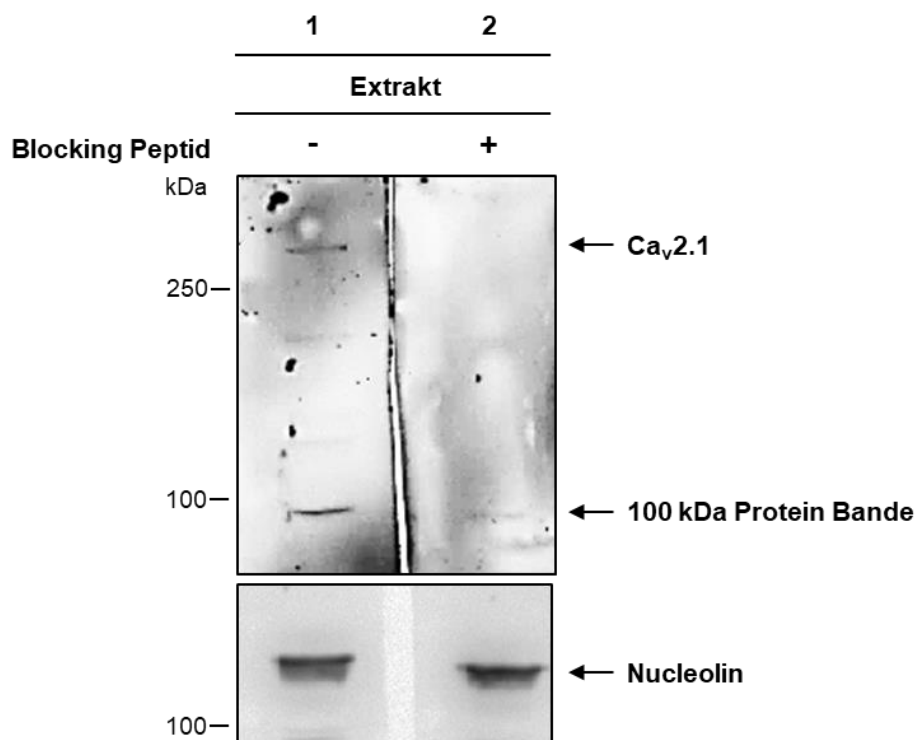
Bei Western Blot Untersuchungen mit dem spezifischen Antikörper für das  $\text{Ca}_v2.1$  Protein fiel eine Proteinbande bei ca. 100 kDa auf. Bei einer Hemmung der CK2 mit CX-4945 wurde diese deutlich schwächer (Abbildung 38 A). Nach einer Quantifizierung konnte eine signifikante Reduktion des Proteins bei 100 kDa um ca. 60% festgestellt werden (Abbildung 38 B). Eine solche Abnahme einer Proteinexpression nach CK2 Inhibition ist äußerst interessant. Möglicherweise steht das Protein mit dem  $\text{Ca}_v2.1$  Kanal in Verbindung oder ist selbst ein Teil von  $\text{Ca}_v2.1$ .

**A****B**

**Abbildung 38: Auswirkungen einer CK2-Hemmung auf die Proteinexpression der 100 kDa Proteinbande in INS-1 832/13 Zellen.** INS-1 832/13 Zellen wurden mit CX-4945 (10  $\mu$ M) behandelt (30 min, 24 h und 48 h). Die Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und mit Lysepuffer aufgeschlossen. Der Gesamtproteingehalt wurde mittels Bradford-Assay ermittelt, die Proben gekocht (95°C, 5 min) und die Proteine (80  $\mu$ g) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden dann auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Blot Membran wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen Cav2.1 (abcam ab181371) behandelt. DMSO diente als Lösemittelkontrolle. **A:** Western Blot Analyse der 100 kDa Proteinbande. Als Ladekontrolle diente Nucleolin. Molekulargewichtsmarker: ThermoFisher™ PageRuler™ Plus Prestained 10-250 kDa. **B:** Quantifizierung der 100 kDa Proteinbanden. Die Proben wurden gegen die Ladekontrolle (Nucleolin) normiert. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM von vier unabhängigen Experimenten. \*\* $P < 0.01$ .

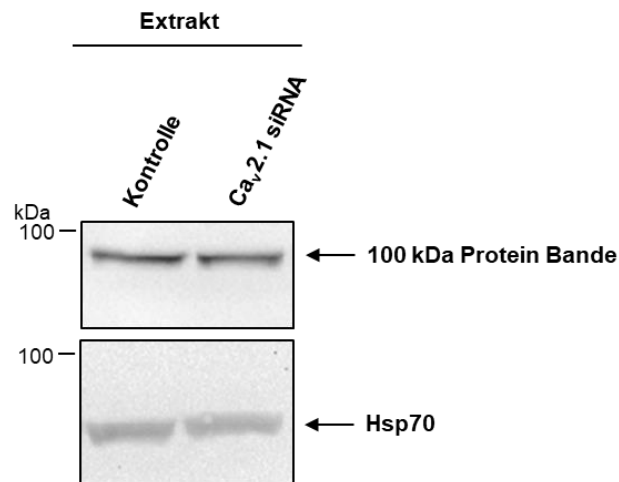
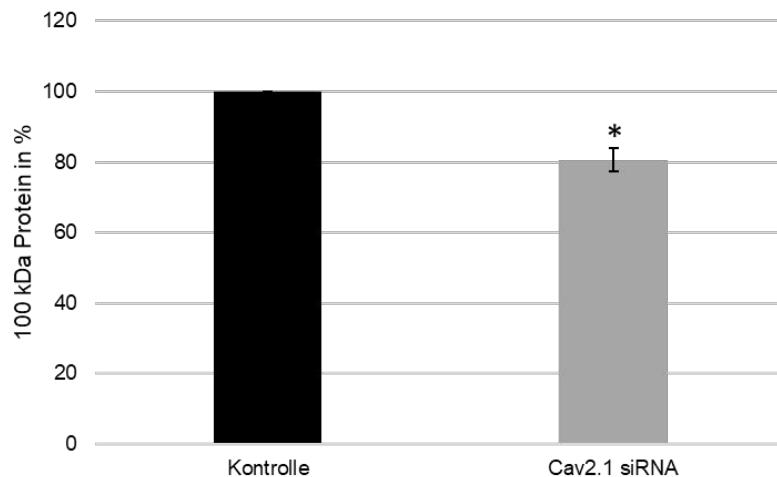
Der für die Immundetektion verwendete Antikörper erkennt die Aminosäuresequenz 2050-2150 des humanen Cav2.1 und ist für Maus und Ratte geeignet. Eine Suche der Sequenz durch BLAST ([www.blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov)) ergab nur Treffer für eine Übereinstimmung mit dem Cav2.1. Um die Spezifität des Antikörpers zu testen wurde zunächst ein Peptid-Kompetitionsassay durchgeführt. Dazu wurde ein „Blocking Peptid“ mit dem Cav2.1

Antikörper inkubiert. Der Antikörper ist damit an das Peptid gebunden und nicht mehr in der Lage an das Epitop des Proteins zu binden. Zellextrakte von INS-1 832/13 wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit der Peptid-Antikörperlösung bzw. mit einer Antikörperlösung zum Vergleich behandelt. In Abbildung 39 ist das Ergebnis des Peptid-Kompetitionsassays zu sehen. Bei einer Vorinkubation mit dem „Blocking Peptid“ (abcam ab205923) kann der Antikörper das  $\text{Ca}_v2.1$  Protein nicht mehr detektieren (Spur 2, ca. 280 kDa). Auf Höhe von 100 kDa ist auch bei Zugabe des Peptids noch eine Bande zu erkennen (Spur 2, ca. 100 kDa), diese ist aber deutlich schwächer als die Bande der Probe ohne Peptid-Kompetition (Spur 1, ca. 100 kDa). Die Bindung des Antikörpers an den  $\text{Ca}_v2.1$  ist spezifisch, für die 100 kDa Bande konnte dies jedoch nicht eindeutig geklärt werden. Die schwächere Bande nach der Peptid-Kompetition gibt einen Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang des 100 kDa Proteins mit dem  $\text{Ca}_v2.1$  Protein.



**Abbildung 39: Überprüfung der Spezifität des  $\text{Ca}_v2.1$  Antikörpers.** INS-1 832/13 Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und mit Lysepuffer aufgeschlossen. Der Gesamtproteingehalt wurde mittels Bradford-Assay ermittelt. Die Proteine (80  $\mu\text{g}$ ) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Immundetektion erfolgte mit unbehandeltem  $\text{Ca}_v2.1$  Antikörper (abcam ab181371) und mit einem „Blocking Peptid“ (20x, abcam ab205923) vorinkubiertem  $\text{Ca}_v2.1$  Antikörper (abcam ab181371) (30 min, RT). Als Ladekontrolle diente Nucleolin. Molekulargewichtsmarker: ThermoFisher™ PageRuler™ Plus Prestained 10-250 kDa.

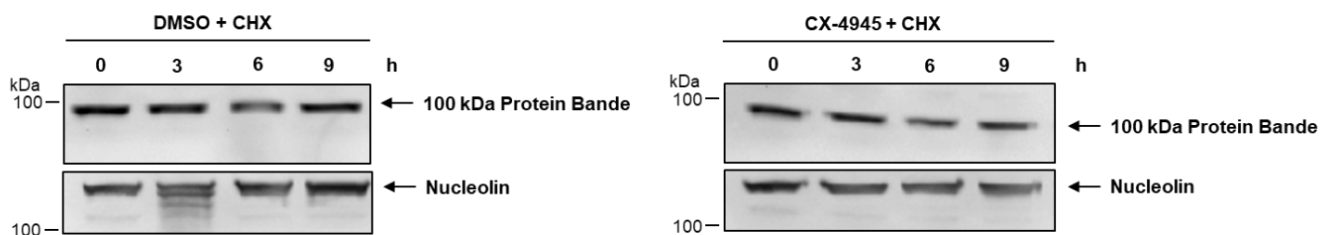
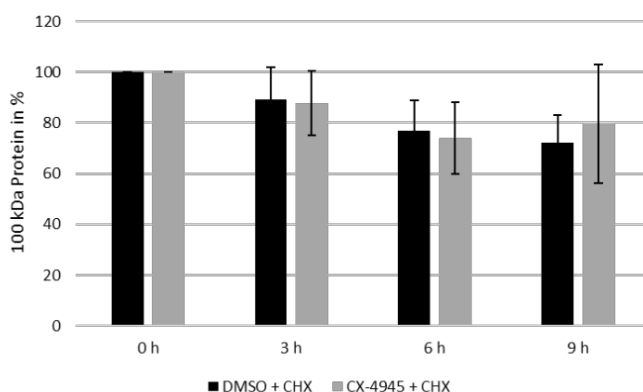
Sollte das 100 kDa Protein mit dem  $\text{Ca}_v2.1$  in Zusammenhang stehen bzw. möglicherweise einen Teil des  $\text{Ca}_v2.1$  darstellen, so sollte ein „knockdown“ des 100 kDa Proteins mittels  $\text{Ca}_v2.1$  siRNA möglich sein. Deshalb wurden INS-1 Zellen mit  $\text{Ca}_v2.1$  siRNA transfiziert und Western Blot Analyse und Immundetektion mit dem Antikörper gegen  $\text{Ca}_v2.1$  hinsichtlich der Proteinexpression der 100 kDa Proteinbande untersucht. Als Ladekontrolle diente HSP70. Die Abbildung 40 A zeigt exemplarisch eine repräsentative Western Blot Untersuchung transfizierter Zellen. Zwischen einer Transfektion mit einer Kontroll siRNA und der Transfektion mit der  $\text{Ca}_v2.1$  siRNA ist ohne Quantifizierung kein Unterschied in der Bandenstärke zu erkennen. Nach einer Quantifizierung der Banden (Abbildung 40 B) zeigt sich eine Reduktion des Proteingehaltes der 100 kDa Protein Bande um ca. 20%.

**A****B**

**Abbildung 40: Proteinexpression der 100 kDa Proteinbande nach Cav2.1 „knockdown“ in INS-1 832/13 Zellen.** INS-1 832/13 Zellen wurden mit Kontroll siRNA (200 nM, Dharmacon, D-001810-10-05) oder Cav2.1 siRNA (200 nM, Dharmacon, L-090177-02-0005) transfiziert (6-well, 48 h, 10 µl DharmaFECT 1). Die Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und mit Lysepuffer aufgeschlossen. Der Gesamtproteingehalt wurde mittels Bradford-Assay ermittelt. Die Proteine (80 µg) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Immundetektion erfolgte mit dem Cav2.1 Antikörper (Abcam ab181371). **A:** Western Blot Analyse der transfizierten Zellextrakte. Die 100 kDa Proteinbande wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen Cav2.1 detektiert (Abcam ab181371, ~280 kDa). Als Ladekontrolle diente HSP70. Molekulargewichtsmarker: ThermoFisher™ PageRuler™ Plus Prestained 10-250 kDa. **B:** Quantifizierung der 100 kDa Proteinbande. Die Proben wurden gegen die Ladekontrolle normiert. Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten, \* $P < 0.05$ .



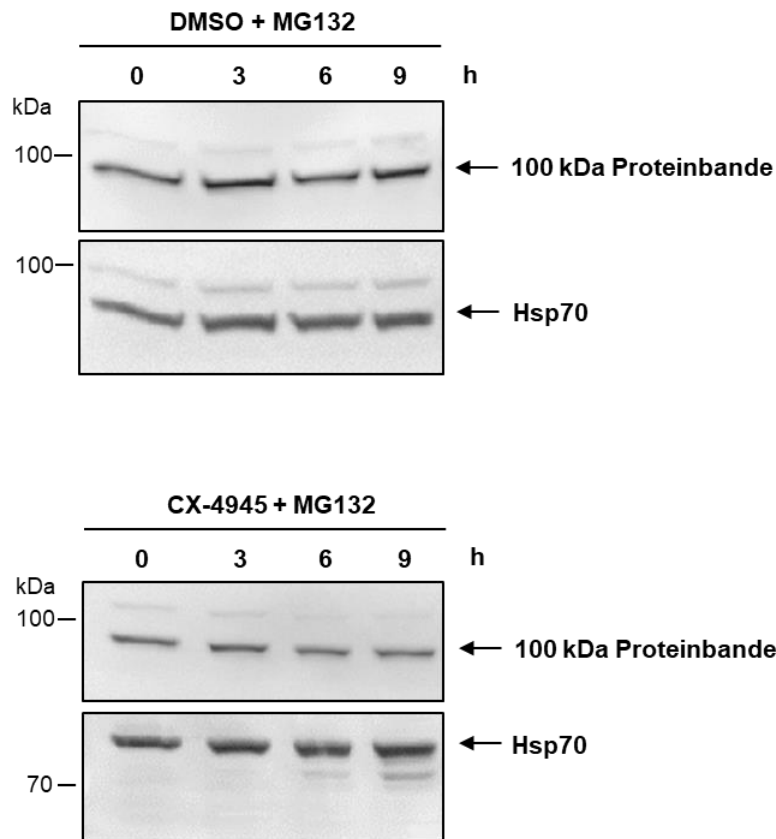
Die 100 kDa Bande wird durch einen „knockdown“ des  $\text{Ca}_v2.1$  Kanals ebenfalls herunter reguliert. Allerdings nicht in gleichem Ausmaß wie das  $\text{Ca}_v2.1$  Protein (ca. 55%) selbst (vgl. Abbildung 37). Auch dieses Experiment lieferte keinen eindeutigen Beweis für die Hypothese, dass das 100 kDa Protein ein Teil des  $\text{Ca}_v2.1$  Kanals sein könnte. Auch wenn die Identifikation nicht hinreichend geklärt werden konnte, wurden weitere Analysen des 100 kDa Proteins durchgeführt, welche im Weiteren beschrieben sind. Zur Überprüfung, ob auch hier die Stabilität des Proteins durch eine Inhibition der CK2 beeinflusst wird, wurde gleichzeitig die Proteinbiosynthese inhibiert. Dazu wurden INS-1 832/13 Zellen mit dem CK2 Inhibitor CX-4945 und mit Cycloheximid (CHX) unterschiedlich lange behandelt (0 h, 3 h, 6 h, 9 h). Aufgrund der schlechten Verträglichkeit von CHX konnten die INS-1 832/13 Zellen nicht über neun Stunden hinaus kultiviert werden. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Auftrennung erfolgte eine Western Blot Analyse und Immundetektion der 100 kDa Bande mit dem Antikörper gegen das  $\text{Ca}_v2.1$  Protein. Als Ladekontrolle diente Nucleolin. Die Proteinbanden wurden anschließend quantifiziert. In der Abbildung 41 sind exemplarisch Western Blots und die Quantifizierung zu sehen. Die Western Blot Analyse (Abbildung 41 A) lässt weder nach einer Hemmung der CK2 noch ohne CK2-Hemmung, größere Unterschiede in der Bandenstärke erkennen. Die Quantifizierung (Abbildung 41 B) zeigt eine Reduktion um bis zu ca. 30% (9 h Behandlung). Es konnte kein Unterschied zwischen den Behandlungen festgestellt werden. Aufgrund der schlechten Verträglichkeit der INS-1 832/13 Zellen von CHX über einen Zeitrahmen von 9 Stunden hinaus konnte die Halbwertszeit des 100 kDa Proteins nicht bestimmt werden. Es scheint sich jedoch um ein äußerst stabiles Protein mit einer langen Halbwertszeit zu handeln. Eine Inhibition der CK2 beeinflusst die Halbwertszeit in dem untersuchten Zeitrahmen (9 h) nicht.

**A****B**

**Abbildung 41: Auswirkungen einer gleichzeitigen Inhibition der CK2 und der Proteinbiosynthese auf die Expression des 100 kDa Proteins in INS-1 832/13 Zellen.** INS-1 832/13 Zellen wurden mit CX-4945 (10  $\mu$ M) und gleichzeitig mit CHX (100  $\mu$ g/ml) behandelt. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 3 h, 6 h, 9 h) geerntet, mit PBS gewaschen und mit Lysepuffer aufgeschlossen. Der Gesamtproteingehalt wurde mittels Bradford-Assay ermittelt, die Proben gekocht (95°C, 5 min) und die Proteine (80  $\mu$ g) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden dann auf eine PVDF-Membran geblottet. DMSO diente als Lösemittelkontrolle. **A:** Immunodetektion des 100 kDa Proteins mit Hilfe des Cav2.1 Antikörpers (Abcam ab181371). Als Ladekontrolle diente Nucleolin. Molekulargewichtsmarker: ThermoFisher™ PageRuler™ Plus Prestained 10-250 kDa. **Links:** Behandlung der Zellen mit CHX (100  $\mu$ g/ml). **Rechts:** Behandlung der Zellen mit CX-4945 (10  $\mu$ M) und CHX (100  $\mu$ g/ml). **B:** Gezeigt ist die Quantifizierung des 100 kDa Proteins. Die Proben wurden gegen die Ladekontrolle (Nucleolin) normiert. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM von vier unabhängigen Experimenten.

Als nächstes wurde untersucht, ob und wie eine Inhibition der CK2 einen Einfluss auf die Degradation des 100 kDa Proteins hat. Daher wurden ein Experiment mit dem eingesetzten Proteasom-Inhibitor MG132 durchgeführt. Dazu wurden INS-1 Zellen mit dem CK2-Inhibitor CX-4945 und mit MG132 (Proteasom-Inhibitor) unterschiedlich lange behandelt (0 h, 3 h, 6 h, 9 h). Aufgrund der schlechten Verträglichkeit der INS-1 832/13 Zellen von MG132 konnten diese auch hier nicht über neun Stunden hinaus kultiviert werden. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend erfolgte eine Western Blot Analyse und

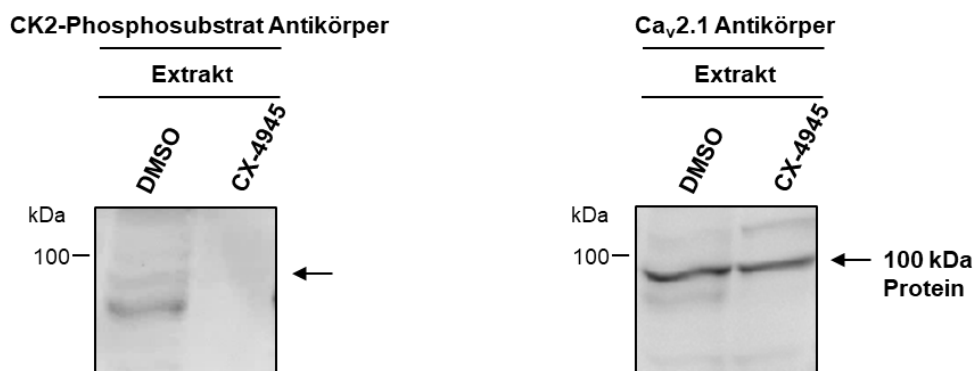
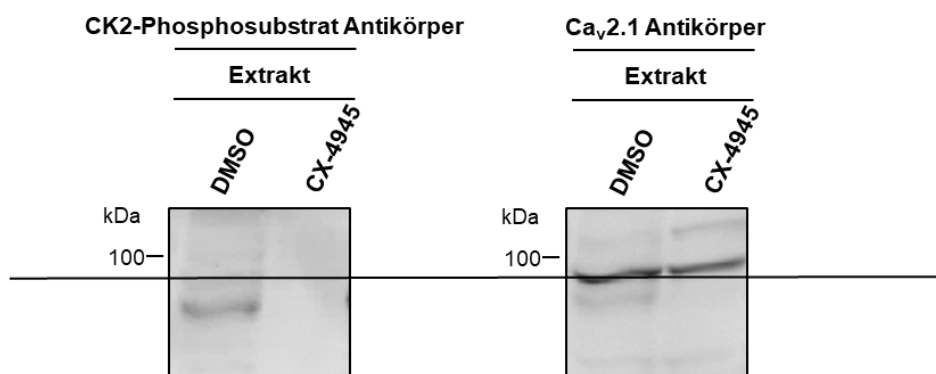
Immundetektion mit einem Antikörper gegen  $\text{Ca}_v2.1$ . Als Ladekontrolle diente HSP70. Ein Unterschied nach einer Inhibition der CK2 ist nicht zu erkennen (Abbildung 42).



**Abbildung 42: Auswirkungen einer gleichzeitigen Inhibition der CK2 und des Proteasoms auf die Proteinexpression der 100 kDa Proteinbande in INS-1 832/13 Zellen.** INS-1 832/13 Zellen wurden mit CX-4945 (10  $\mu\text{M}$ ) und gleichzeitig mit MG132 (5  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 3 h, 6 h, 9 h) geerntet, mit PBS gewaschen und mit Lysepuffer aufgeschlossen. Der Gesamtproteingehalt wurde mittels Bradford-Assay ermittelt, die Proben gekocht (95°C, 5 min) und die Proteine (80  $\mu\text{g}$ ) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden dann auf eine PVDF-Membran geblottet. Die 100 kDa Proteinbande wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen  $\text{Ca}_v2.1$  detektiert (Abcam ab181371). Als Ladekontrolle sowie Kontrolle der Inhibition diente HSP70. Molekulargewichtsmarker: ThermoFisher™ PageRuler™ Plus Prestained 10-250 kDa.

Um einen Hinweis auf eine mögliche Phosphorylierung des 100 kDa Proteins durch die CK2 zu bekommen, wurden INS-1 832/13 Zellen mit CX-4945 behandelt und die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Auftrennung erfolgte eine Western Blot Analyse und Immundetektion mit einem Antikörper, welcher Proteine erkennt die eine phosphorylierte CK2 Konsensussequenz besitzen. Anschließend erfolgte mit der gleichen Blotmembran eine

Detektion durch den Cav2.1 Antikörper. Abbildung 43 A zeigt die Immundetektion mit dem CK2-Phosphosubstrat Antikörper und die anschließende Detektion mit dem Cav<sub>v</sub>2.1 Antikörper (Abbildung 43, rechts). Die Western Blot Analyse mit dem Cav<sub>v</sub>2.1 Antikörper zeigt kein Bandenmuster mehr nach einer Behandlung der INS-1 Zellen mit CX-4945. Bei der Kontrolle (DMSO) sind mehrere Banden zu sehen, unter anderem eine bei ca. 100 kDa, welche dem Protein entsprechen könnte. Nach einer anschließenden Behandlung der Membran mit dem Cav<sub>v</sub>2.1 Antikörper zeigt sich auf gleicher Höhe eine Bande für das 100 kDa Protein. Zum Vergleich ist in der Abbildung 43 B eine Linie zwischen den beiden Detektionen gezogen worden. Da es sich um Gesamtzellextrakt bei der Probe handelt, kann die Phosphorylierungsbande nicht eindeutig Cav<sub>v</sub>2.1 zugewiesen werden. Das Experiment deutet aber darauf hin, dass das 100 kDa Protein durch die CK2 phosphoryliert wird.

**A****B**

**Abbildung 43: Phosphorylierung des 100 kDa Proteins in INS-1 832/13 Zellen nach Hemmung der CK2.** INS-1 832/13 Zellen wurden mit CX-4945 (10  $\mu$ M) behandelt (16 h). Die Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und mit Lysepuffer aufgeschlossen. Der Gesamtproteingehalt wurde mittels Bradford ermittelt, die Proben gekocht (95°C, 5 min) und die Proteine (80  $\mu$ g) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden dann auf eine PVDF-Membran geblottet. Molekulargewichtsmarker: ThermoFisher™ PageRuler™ Plus Prestained 10-250 kDa. **Links:** Die CK2 Phosphorylierung wurde mit Hilfe eines CK2-Phosphosubstrat Antikörpers (CST, #8738) untersucht. **Rechts:** Anschließend wurde das 100 kDa Protein mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen das Ca<sub>v</sub>2.1 Protein detektiert (abcam ab181371).

Die Identifikation der 100 kDa Bande konnte durch den Peptid-Kompetitionsassay und den „knockdown“ nicht hinreichend geklärt werden. Es konnten zwar Hinweise für die Hypothese gefunden werden, dass es sich um ein Teilstück des Ca<sub>v</sub>2.1 handelt, es bedarf aber weiterer Experimente, um dies eindeutig belegen zu können. Allerdings können durch die gezeigten Experimente verschiedene Aussagen getroffen werden. Zum einen sinkt der Proteingehalt der 100 kDa Bande durch eine CK2 Inhibition signifikant. Die Halbwertszeit des Proteins geht deutlich über neun Stunden hinaus und wird durch eine CK2 Inhibition nicht beeinflusst. Die Proteinbiosynthese des 100 kDa Protein wird durch eine CK2-Hemmung nicht beeinflusst.

Außerdem konnte ein Hinweis auf eine mögliche Phosphorylierung des Proteins durch die CK2 gezeigt werden. Um eine endgültige Aussage treffen zu können, sind allerdings weitere Experimente dringend erforderlich.

## 7. Diskussion

Die pankreatischen Langerhans-Inseln spielen eine Schlüsselrolle bei der überlebenswichtigen Homöostase des Blutglucosespiegels [3]. Steigt dieser im Blut über 7 mM Glucose, sezernieren die sogenannten  $\beta$ -Zellen der pankreatischen Langerhans-Inseln das Hormon Insulin [5, 9]. Dieses stimuliert unter anderem die Aufnahme von Glucose aus dem Blut ins Fettgewebe bzw. die Muskeln [7].

In der Literatur gibt es mehrere Hinweise darauf, dass die Proteinkinase CK2 einen negativen regulatorischen Effekt auf die Glucose-stimulierten Insulinbiosynthese und -sekretion hat [97, 100, 116, 117, 122, 147]. Auch in Arbeiten der Arbeitsgruppe Montenarh konnte auf einen negativer Einfluss der CK2-Phosphorylierung hingewiesen werden [119–121]. Es konnte gezeigt werden dass PDX-1, der Haupttranskriptionsfaktor für die Expression des Insulins, sowie der Transkriptionsfaktor USF1, der ebenfalls in die Regulation der Insulinproduktion involviert ist [156] Substrate der CK2 darstellen [97, 157]. Durch die CK2-Phosphorylierung wird die Aktivität von PDX-1 reduziert [97] und der Transkriptionsfaktor wird destabilisiert und proteasomal abgebaut [119]. Das Insulingen wird damit abhängig von der PDX-1 Phosphorylierung durch die CK2 reguliert [121]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die CK2-Hemmung in MIN6 Zellen (pankreatischen murinen  $\beta$ -Zellen) eine erhöhte Insulinsekretion zu Folge hat [120]. Vor kurzem wurde eine Studie von Lan et al. [158] veröffentlicht, welche zeigt, dass die CK2 Gen- und Proteinexpression im Diabetes mellitus Typ 2 Mausmodell erhöht ist. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in Serumproben von Diabetes mellitus Typ 2 Patienten beobachtet werden, allerdings handelte es sich dabei um eine kleine Stichprobengröße [158]. CK2 ist hoch konserviert, ubiquitär vorkommend und nimmt mit über 400 Substraten eine wichtige Rolle in vielen zellulären Prozessen ein [70, 86, 88, 93–96, 101–104, 120]. Trotzdem sind noch vergleichbar wenige Substrate in der  $\beta$ -Zelle bekannt [100, 116, 117, 119].

In der vorliegenden Dissertation wurden die Auswirkungen einer Hemmung der Proteinkinase CK2 auf die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration und die Glucose-stimulierte Insulinsekretion in pankreatischen  $\beta$ -Zellen untersucht. Dabei wurde der spannungsabhängige Calciumkanal  $\text{Ca}_v2.1$  als ein neues potentiell Zielmolekül der CK2 betrachtet. Das in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Modellsystem war die pankreatische  $\beta$ -Zelllinie INS-1 832/13 aus der Ratte, die in kleinen Zellverbänden, ähnlich den Langerhans-Inseln im lebenden Organismus, wachsen. Die Zellen sezernieren auf einen Glucose-Stimulus hin Insulin [159, 160]. Im Zellkulturmodell können gezielt Auswirkungen von geringen Mengen an Teststimuli oder Hemmstoffen auf  $\beta$ -Zellen untersucht werden ohne Beeinflussung von z.B. organischen Wirkungen. Hierdurch sind die Experimente leichter reproduzierbar als in primären Inseln. Die

Langerhans-Inseln machen nur ca. 1-2% der Masse des Pankreas aus [2], besitzen in Kultur nur eine begrenzte Lebenserwartung und durch die fehlende Adhärenz kommt es zu Zellverlusten. Die Notwendigkeit von primären Inselzellen sollte daher genauestens abgewogen werden, da die Anzahl der benötigten Tiere für z.B. Western Blot oder Insulinsekretions Untersuchungen mitunter sehr hoch sein kann. Im Vergleich zu primären Pankreasinseln als auch zu den murinen pankreatischen MIN6  $\beta$ -Zellen lassen sich die INS-1 832/13 leichter in Kultur halten und behalten länger ihre Glucoseresponsivität. Durch die Transfektion mit einem Plasmid, welches das humane Proinsulin Gen enthält, bleibt die Glucoseresponsivität der INS-1 832/13 Zellen über 66 Populationen hinweg stabil erhalten und die Glucose-stimulierte Insulinsekretion der INS-1 832/13 ist um ein 5-faches geringer als in primären Ratteninseln. Die GSIS der parentalen INS-1 Zelllinie ist um das 11-fache geringer [128]. Somit kommen die in INS-1 832/13 Zellen näher an die Gegebenheiten in Langerhans-Inseln heran. Bei der Verwendung von Zellkultur-Zellen ergeben sich jedoch auch Nachteile. Organübergreifende Mechanismen werden nicht berücksichtigt und damit können immer nur begrenzt Rückschlüsse auf den zu erwartenden Effekt im Organismus gezogen werden. Außerdem können durch die längere Haltung der Zellen in Kultur zellspezifische Funktionen verloren gehen. Dennoch überwiegen die Vorteile einer Zellkultur mit INS-1 832/13 verglichen zu primären Inselzellen. Zunächst wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Funktionalität der INS-1 832/13 Zellen bestätigt. Die Zellen wurden dabei hinsichtlich ihrer Fähigkeit nach einer Nahrungskarenz (0 mM Glucose) auf einen Glucose-Stimulus zu reagieren getestet. Nach einer Glucose-Stimulation mit 10 mM Glucose war die Insulinkonzentration um das 1.3-fache erhöht. Wie auch in der Literatur beschrieben [160, 161] war ein Behandlungszeitraum von 30 min ausreichend um eine deutliche Insulinsekretion nach Stimulation mit Glucose zu sehen.

Zur Untersuchung des Einflusses der CK2 auf die Insulinsekretion und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration in INS-1 832/13 Zellen wurde deren Enzymaktivität mit Hilfe von Hemmstoffen inhibiert. Der Hemmstoff eines Enzyms sollte dabei möglichst spezifisch sein, um unerwünschte Effekte zu verhindern. Die Verwendung von Hemmstoffen hat die Vorteile einer einfachen Handhabung, einer meist guten Hemmung, sowie eine gleichmäßige CK2-Hemmung aller Zellen. Die Nachteile der Verwendung von Inhibitoren sind auftretende Nebenwirkungen, wie z.B. die Inhibition anderer Kinasen. Zur Hemmung der CK2-Kinaseaktivität wurden in dieser Arbeit die ATP-kompetitiven Inhibitoren CX-4945 und Quinalizarin [162, 163] verwendet. Diese konkurrieren mit ATP um die Bindestelle im katalytischen Zentrum der CK2 ( $\text{CK2}\alpha$  und  $\text{CK2}\alpha'$ ) und hemmen nur wenige andere Kinasen [162, 164–166]. Quinalizarin wurde an 140 Kinasen auf seine Spezifität getestet und besitzt *in vitro* einen  $\text{Ki}$ -Wert von 52 nM [143, 162], CX-4945 besitzt *in vitro* einen  $\text{Ki}$ -Wert von 0.38 nM und seine Spezifität wurde an 235 Kinasen analysiert [144]. Außerdem wird CX-4945 auch in



klinischen Studien zur Tumorthherapie eingesetzt [148]. Auch wenn seine Spezifität für die CK2 sehr hoch ist, wurde für CX-4945 auch eine CK2-unabhängige Funktion bei der Regulation des alternativen Spleißens beschrieben [167]. Im Vergleich zu Quinalizarin und CX-4945 besitzt der CK2-Inhibitor TBB, welcher nicht in dieser Arbeit verwendet wurde, einen Ki-Wert von 400 nM und seine Spezifität wurde an 33 Kinasen getestet. Wobei noch drei andere Kinasen durch TBB inhibiert wurden [168]. Die Konzentrationen der in dieser Arbeit verwendeten CK2-Hemmstoffe wurden aufgrund von Experimenten der Arbeitsgruppe Montenarh in anderen pankreatischen Zelllinien gewählt (CX-4945: 10  $\mu$ M, Quinalizarin: 50  $\mu$ M) [120, 169]. Da sich Zelllinien unter anderem hinsichtlich der Aufnahme und des Exports von Stoffen bzw. des intrazellulären Transports unterscheiden können, mussten die Hemmstoffe zunächst in der Zelllinie INS-1 832/13 getestet werden [170]. Durch ein *in vitro*-CK2-Kinaseaktivitätsassay konnte gezeigt werden, dass die CK2-Kinaseaktivität mit den beiden Inhibitoren gehemmt wird ohne, dass sich die Proteinexpression der CK2-Untereinheiten dabei verändert. Bei einer Inhibition über einen 30-minütigen Zeitraum blieben die Zellen vital und zeigten kein Anzeichen von Apoptose, weswegen dieser Zeitraum für weitere Experimente selektiert wurde. Als Apoptosenachweis diente die Spaltung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP). Das Enzym PARP ist an der DNA-Reparatur beteiligt. Sein proteolytischer Abbau durch eine Caspase ist ein Zwischenschritt der Apoptose [134]. Bei Experimenten bei denen die CK2 länger als 24 Stunden inhibiert wurde, starben die Zellen teilweise ab. Durch die Einleitung der Apoptose können zahlreiche intrazelluläre Faktoren beeinflusst werden, was die Ergebnisse bezüglich der Insulinsekretion verändern könnte. In der vorliegenden Arbeit wurden Experimente durchgeführt, welche über 24 Stunden hinaus gehen. Dabei wurden für die Western Blot Untersuchungen zwar nur die lebenden Zellen geerntet, doch auch hier kann die Einleitung der Apoptose schon stattgefunden haben und daher sind die erhaltenen Ergebnisse hier mit Vorsicht zu betrachten.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die INS-1 832/13 Zellen funktional sind und die CK2 erfolgreich in ihnen gehemmt werden konnte, wurde die Insulinsekretion nach einer CK2-Hemmung mit CX-4945 und Quinalizarin in diesen Zellen näher analysiert. Eine Inkubation der Zellen in Glucose-freiem Medium führt direkt nach einer Stimulation mit Glucose zur Insulinsekretion. Diese verläuft biphasisch, mit einem spitzen Peak bei ca. 4 min und einem breiteren Peak nach ca. 25 min [160]. Da die Zeitpunkte der Probenentnahme anders gewählt waren, konnte dieser biphasische Verlauf nicht beobachtet werden. Nach einer Inhibition der CK2 findet über den Zeitraum von 30 Minuten eine signifikante Steigerung der Insulinsekretion bei beiden Inhibitoren im Vergleich zur Kontrolle statt. Die Aussage aller Experimente war dabei die gleiche: nach einer Hemmung der CK2 ist die Insulinsekretion gesteigert. Allerdings gab es Schwankungen in den Werten, da die Reaktion unter anderem abhängig ist von der Passagenzahl und der Dichte der Zellen, weswegen bei jedem Versuch mehrere

Lösemittelkontrollen mitgeführt wurden. Bei einer Hemmung der CK2 mit Quinalizarin war höchste Insulinsekretion nach 20 Minuten zu beobachten. Die Sekretion war hier um das 1.6-fache gesteigert. Wurde die CK2 mit CX-4945 inhibiert, konnte ein Anstieg der Insulinsekretion bis 30 Minuten festgestellt werden. Nach diesen 30 Minuten wurde das Experiment beendet. Die Insulinsekretion war zu diesem Zeitpunkt um das 2.5-fache erhöht. In weiteren Analysen wäre es interessant zu untersuchen, ob die Insulinsekretion nach einer CK2-Hemmung mit CX-4945 auch über die 30 Minuten hinaus weiter gesteigert wird. Zur Überprüfung, inwiefern die erhaltenen Ergebnisse der INS-1 832/13 Zellen auch auf die Inselzellen übertragbar sind, wurden murine Langerhans-Inseln ebenfalls auf ihre Insulinsekretion hin nach einer CK2-Hemmung untersucht. Auch hier zeigte sich eine signifikante Steigerung der Insulinsekretion um das 2.1-fache nach CK2-Hemmung mit CX-4945. Die Experimente wurden dabei nur mit CX-4945 durchgeführt, um die Versuchstierzahl möglichst gering zu halten. Normalerweise ist die Insulinsekretion in Inselzellen deutlich höher als die Sekretion in  $\beta$ -Zelllinien [128], jedoch ist es schwierig in diesem Experiment einen direkten Vergleich zu ziehen, aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an sekretierenden Zellen. Trotz ungleicher Zellzahl ist die Aussage in beiden Systemen die gleiche: Nach einer Hemmung der CK2 steigt die Insulinsekretion. Dies stimmt mit Beobachtungen anderer Studien überein [120, 122] und gibt einen Hinweis auf eine mögliche ähnliche Funktion der CK2 im lebenden Organismus. Des Weiteren konnten Spohrer et al. [147] zeigen, dass auch die Insulinproteinexpression in murinen Langerhans-Inseln nach einer CK2-Hemmung erhöht ist. Der Transport der insulinhaltigen Vesikel zur Membran, wo schließlich die Exozytose stattfindet wird durch eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration vermittelt. Die Erhöhung ist bedingt durch das Öffnen spannungsabhängiger Calciumkanäle nach einem Glucose-Stimulus. Eine veränderte Insulinsekretion nach einer Inhibition der CK2 könnte somit auch durch eine Änderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration bedingt sein. Bei den folgenden Experimenten habe ich mich auf den Einsatz des CK2-Hemmstoffes CX-4945 zur Inhibition der CK2 konzentriert, da dieser bereits in klinischen Studien als Therapeutikum in der Tumorthherapie eingesetzt wird [148]. Die intrazelluläre Calciumkonzentration wurde mit Hilfe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikators Fura 2-AM bestimmt. Dabei wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten Fluoreszenzänderung bei 340 nm ( $\text{Ca}^{2+}$ -Fura 2-Komplex) und bei 380 nm (freies Fura 2) gemessen. Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration wird dann durch das Verhältnis der Fluoreszenz bei 340/380 nm ermittelt. Der Verlauf der gezeigten Kurven der F340/380 Ratio Werte ist vergleichbar mit Verläufen von F340/380 Werten von unterschiedlichen Calciumversuchen mit TRP-Kanälen („Transient receptor potential cation channel“) [171, 172]. Ich konnte zeigen, dass nach einer Inhibition der CK2 mit CX-4945 auch die intrazelluläre Calciumkonzentration signifikant um das 1.2-fache erhöht ist. Die gesteigerte Insulinsekretion nach CK2-Hemmung ist damit sehr

wahrscheinlich durch die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration bedingt. In pankreatischen  $\beta$ -Zellen erfolgt der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration durch den Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  über Calciumkanäle oder durch Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern, wie dem Endoplasmatischen Retikulum, Mitochondrien oder sekretorischen Vesikeln [173]. In der vorliegenden Arbeit konnte ich erstmals zeigen, dass die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration nach CK2-Hemmung durch einen Einstrom extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bedingt ist.

In den INS-1 Zellen sind mehrere Typen von spannungsabhängigen Calciumkanälen exprimiert:  $\text{Ca}_v1.3$  (L-Typ),  $\text{Ca}_v2.1$  (P/Q-Typ) und  $\text{Ca}_v2.3$  (R-Typ) [33]. R-Typ Kanäle sind im Menschen nicht exprimiert und waren damit für die Fragestellung in dieser Dissertation nicht relevant. Die Arbeitsgruppe um Braun et al. [34] haben ein Modell für die elektrische Aktivität in humanen  $\beta$ -Zellen aufgestellt: Die Schließung von  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanälen führt zu einer Depolarisation des Membranpotentials auf  $> -55$  mV. Dadurch werden T-Typ- ( $> -60$  mV) und L-Typ-Kanäle ( $> -50$  mV) aktiviert, welche das Aktionspotential initiieren. Während des Anstiegs des Aktionspotentials öffnen sich spannungsabhängige  $\text{Na}^+$ -Kanäle ( $> -40$  mV), wodurch es zu einer Beschleunigung des Anstiegs kommt. Schließlich kommt es zur Aktivierung des P/Q-Typs ( $> -20$  mV). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx über den P/Q-Typ ( $\text{Ca}_v2.1$ ) löst unmittelbar die Exozytose insulinhaltiger Vesikel aus. Der L-Typ-Kanal ist laut diesem Modell somit wichtiger für die Generierung des Aktionspotentials und der P/Q-Typ-Kanal für die Insulinsekretion. Dabei hat eine Inhibition des  $\text{Ca}_v2.1$  eine Reduktion der Glucose-stimulierten Insulinsekretion um 60-70% zu Folge [34]. Des Weiteren hat die Gruppe um Kahle et al. [149] mittels eines Hefe-Zwei-Hybrid-Systems gegen die cDNA Bibliothek des menschlichen Gehirns gezeigt, dass die CK2 $\beta$ -Untereinheit mit dem C-Terminus von  $\text{Ca}_v2.1$  interagiert. Da der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx über den  $\text{Ca}_v2.1$ -Kanal hauptsächlich für die Insulin Exozytose verantwortlich zu sein scheint [34] und ich durch meine Experimente eine signifikante Steigerung der Insulinsekretion und der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration nach CK2-Hemmung zeigen konnte, habe ich in der vorliegenden Arbeit den  $\text{Ca}_v2.1$ -Kanal als Zielmolekül für die CK2 näher betrachtet. Mittels Hemmung der CK2 in INS-1 832/13 Zellen mit CX-4945 und einem anschließenden Phosphorylierungsassay mit den Gesamtzellextrakten, konnte ein erster Hinweis auf eine Phosphorylierung des endogenen  $\text{Ca}_v2.1$ -Kanals durch die CK2 erzielt werden. Durch die duale Cosubstratspezifität der CK2 [73, 89] konnte mittels Verwendung von [ $^{32}\text{P}$ ]- $\alpha$ -GTP die Kinaseaktivität spezifischer der CK2 zugeordnet werden. Da bei dem Experiment Gesamtzellextrakte untersucht wurden, kann die beobachtete Phosphorylierung allerdings noch nicht eindeutig dem  $\text{Ca}_v2.1$  zugeordnet werden. In einem nächsten Schritt wurde daher die Aminosäuresequenz von  $\text{Ca}_v2.1$  mit Hilfe verschiedener Programme (<https://scansite4.mit.edu/4.0/#home>, [www.prosite.expasy.org](http://www.prosite.expasy.org) und <http://www.cbs.dtu.dk>) auf CK2 Konsensussequenzen untersucht. Die Untersuchung wurde dabei hauptsächlich auf den

C-Terminus (AS 1764-2369) beschränkt, da dort bereits eine Interaktion der CK2 $\beta$ -Untereinheit beschrieben wurde [149]. Die durchgeführte *in silico* Analyse zeigte zehn putative CK2-Phosphorylierungsstellen (T1854, T1961, S2028, T2066, T2123, S2201, T2300, S2304, S2362 und S2364) im C-Terminus von Ca $_v$ 2.1. Acht dieser Phosphorylierungsstellen (T1854, T1961, S2028, T2066, T2123, S2201, S2362 und S2364) sind zwischen Maus, Ratte und Mensch konserviert, was ein Hinweis auf die funktionelle Relevanz dieser Domäne ist. Die Analyse zeigte ebenfalls ein Serin (S1677) in einer extrazellulären Domäne des Ca $_v$ 2.1-Kanals. Diese CK2-Phosphorylierungsstelle ist ebenfalls zwischen Maus, Ratte und Mensch konserviert und war die einzige, die auch noch bei der Hochstringenz Einstellung des Programms angezeigt wurde. Da die CK2 auch als Ektokinase beschrieben ist, [112, 114] wurde auch diese Stelle für weitere Untersuchungen miteingeschlossen. Neben dem Einsatz von spezifischen Hemmstoffen können auch Phosphorylierungsmutanten verwendet werden um die CK2-Phosphorylierung eines Proteins zu untersuchen. Das von der CK2 phosphorylierte Serin bzw. Threonin wird dabei zu einer anderen Aminosäure (meistens Alanin) mutiert und somit die Phosphorylierung verhindert. In Peptidfilteranalysen wurden Peptide (15 Aminosäuren), welche jeweils eine oder zwei Phosphorylierungsstelle umfassten und ihre jeweiligen Phosphorylierungsmutanten analysiert. Die Methode wird häufig dazu eingesetzt eine große Anzahl an möglichen Phosphorylierungsstellen in kurzer Zeit zu überprüfen [152, 153]. Durch die Peptidfilterassays konnten die Serine an Position 1677, 2362 und 2364 als CK2-Phosphorylierungsstellen *in vitro* identifiziert werden. Die Peptide, welche diese Phosphorylierungsstellen umfassten, zeigten bei der Analyse ein starkes Signal. Dieses Signal war bei der Mutante von A1677 und der Doppelmutante A2362/A2364 nicht mehr zu beobachten. Die Phosphorylierungsstellen S2362 und S2364 wurden aufgrund ihrer Nähe in dem gleichen Peptid untersucht. Erst durch die Mutation beider Serine konnte kein Signal mehr beobachtet werden. Die Einzelmutationen A2362/S2364 und S2362/A2364 zeigten weiterhin ein Signal. Die putativen Phosphorylierungsstellen S2201 und T1854 zeigten zwar ebenfalls Signale allerdings konnten diese auch bei der Mutation bzw. der Kontrollbehandlung ohne CK2 beobachtet werden. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um eine unspezifische Bindung von [ $^{32}$ P]- $\gamma$ -ATP an die  $\beta$ -Untereinheit von CK2 und nicht um eine CK2-abhängige Phosphorylierung. Die Proteinkinase CK2 phosphoryliert bevorzugt Serine und Threonine in saurer Umgebung mit der minimalen Konsensussequenz S/TxxD/E [70]. Das Serin an Position 2028 liegt in einer solchen präferierten Umgebung, zeigte aber zunächst bei der Peptidfilteranalyse kein Signal. Erst nach einer langen Exposition der Membran konnte eine Phosphorylierung dieser Stelle detektiert werden (nicht gezeigt). Diese ist jedoch von der Signalstärke nicht vergleichbar mit der Phosphorylierung von S1677, S2362 und S2364 und wurde deshalb nicht für weitere Analysen gewählt. CK2-Substrate können in drei Klassen eingeteilt werden. Klasse I sind Substrate, die sowohl von den katalytischen Untereinheiten

CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$  alleine sowie von dem CK2-Holoenzym phosphoryliert werden. Zu der Klasse II gehören Substrate, die ausschließlich durch die katalytischen Untereinheiten CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$  phosphoryliert werden. Die Substrate der Klasse III werden nur durch das CK2-Holoenzym phosphoryliert [87]. Durch die Peptidfilteranalysen konnte ich zeigen, dass S1677, S2362 und S2364 auch durch die CK2 $\alpha$ -Untereinheit alleine phosphoryliert werden. In Bezugnahme auf die Einteilung durch Pinna [87] können die CK2-Phosphorylierungsstellen der Klasse I zugeordnet werden. Die Ergebnisse der Peptidfilteranalysen können möglicherweise nicht direkt auf das vollständige Protein übertragen werden, aufgrund der geringen Größe der Peptide (15 AS). Daher wurden die putativen Phosphorylierungsstellen (S1677, S2362 und S2364) zusätzlich mit in Bakterien produzierten GST-Ca $_v$ 2.1 Fusionsproteinen durch *in vitro* Phosphorylierungsassays bestätigt. Die Experimente wurden mit dem Wildtyp GST-Ca $_v$ 2.1 (1666-1738) und GST-Ca $_v$ 2.1 (2177-2369) und den jeweiligen Phosphorylierungsmutanten (S1677A, S2362G, S2364A, und S2362A/S2364A) durchgeführt. Die Herstellung der Einzelmutation des Serins an der Stelle 2362 zu Alanin erwies sich als äußerst schwierig, weswegen mit einer Glycin Einzelmutante gearbeitet wurde. Glycin wird, wie Alanin ebenfalls nicht durch die CK2 phosphoryliert, gilt aber als „Strukturbrecher“. Bei der Doppelmutante wurden deshalb beide Serine zu Alanin mutiert. Die Ergebnisse der *in vitro* Phosphorylierungsassays konnten die zuvor gemachten Beobachtungen der Peptidfilteranalysen bestätigen. Die Phosphorylierung von S1677A und S2362A/S2364A blieb im Vergleich zum Wildtyp aus bzw. war stark verringert. Die S2362 und S2364 Einzelmutanten wurden ebenso stark phosphoryliert wie der Wildtyp und sind somit beide *in vitro* CK2-Phosphorylierungsstellen. Auch die Phosphorylierung durch die CK2 $\alpha$  alleine konnte für alle drei CK2-Phosphorylierungsstellen verifiziert werden. Das Serin an Position 1677 befindet sich in einer extrazellulären Domäne, zwischen den Segmenten S5 und S6 des vierten homologen Abschnitts. Die Segmente S5 und S6 aller homologen Abschnitten bilden zusammen mit den *p-loops* den Ionenkanal [19]. Eine Phosphorylierung an dieser Stelle ist natürlich äußerst interessant, da sie möglicherweise einen direkten Einfluss auf das Öffnen bzw. das Schließen der Pore hätte. Allerdings könnte eine Proteinkinase aufgrund ihrer Größe und Struktur auch Schwierigkeiten haben, diese Stelle überhaupt zu erreichen. Die Arbeitsgruppe um Wei et al. [174] konnten für den im Herz exprimierten L-Typ Calciumkanal Ca $_v$ 1.2 in Oozyten des *Xenopus* zeigen, dass eine partielle Deletion des C-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit eine gesteigerte Kanal-Aktivität zu Folge hat. Sie schlussfolgern daraus, dass der C-Terminus durch Faltung die Aktivität des Kanals inhibiert und diese Hemmung durch eine Phosphorylierung aufgehoben werden kann. Andere Arbeitsgruppen konnten dies durch Untersuchungen in der humanen Nierenzelllinie tsa201 bestätigen und haben gezeigt, dass der distale C-Terminus von Ca $_v$ 1.2 *in vivo* proteolytisch gespalten wird, nicht-kovalent an den proximalen C-Terminus bindet und damit die Kanal-Aktivität inhibiert [55, 175, 176].

Nachfolgend konnte durch weitere Studien in der humanen Nierenzelllinie tsa201 gezeigt werden, dass durch eine CK2-Phosphorylierung von T1704 im proximalen C-Terminus des L-Typ Calciumkanals  $\text{Ca}_v1.2$ , dieser autoinhibitorische Effekt aufgehoben wird [66, 67]. Ein ähnlicher Mechanismus der Regulation durch eine CK2-Phosphorylierung von S2362 und S2364 am C-Terminus wäre auch für den  $\text{Ca}_v2.1$ -Kanal denkbar, wobei die Phosphorylierung hier möglicherweise eher einen inhibitorischen Effekt ausübt. In Bakterien exprimierte rekombinante Proteine werden nicht posttranslational modifiziert, da diese Prozesse Modifikationen (Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung oder Ubiquitinierung) nicht in Bakterien stattfinden. Die durchgeführten *in vitro* Phosphorylierungsassays mit unmodifizierten Proteinen können somit natürlich nicht eins zu eins auf die native Funktion dieser Proteine übertragen werden. Die zuvor gezeigte mögliche Phosphorylierung des endogenen  $\text{Ca}_v2.1$  sowie die gezeigten *in vitro* Phosphorylierungsexperimente deuten allerdings stark darauf hin, dass der  $\text{Ca}_v2.1$  auch *in vivo* ein Substrat für die CK2 darstellt.

Als weitere Methoden, die Aktivität eines Proteins zu regulieren und somit seine Rolle während eines Prozesses zu untersuchen, können z.B. ein „knockdown“ des Proteins durch siRNA (*small interfering RNA*) oder ein „knockout“ durch das CRISPR/Cas System genutzt werden. Eine siRNA erkennt komplementäre mRNA Sequenzen und führt zu deren Spaltung und Abbau, womit kein Protein exprimiert werden kann. Dadurch würde allerdings nicht nur die Aktivität der Proteinkinase CK2 gehemmt, sondern auch die Proteinmenge der CK2 reduziert, wodurch auch die Interaktion mit Bindungspartnern verringert bzw. verhindert werden würde. Eine Regulation durch die CK2 kann auch nur über Protein-Protein-Bindung stattfinden [177]. Insofern würde ein solcher Versuchsaufbau möglicherweise zu ungewollten Nebeneffekten führen. Ein „knockout“ durch z.B. die CRISPR/Cas Methode wäre hinsichtlich einer späteren Therapie von Typ 2 Diabetes mellitus ebenso nicht sinnvoll. Das humane Immunsystem könnte möglicherweise die bakterielle Endonuklease Cas9 als Antigen identifizieren und Zellen, die das CRISPR/Cas-System aufgenommen haben, würden durch Apoptose zerstört werden [178]. Somit würde nicht nur die therapeutische Wirkung zunichte gemacht werden, sondern darüber hinaus bestände das Risiko einer Autoimmunreaktion sowie einer potentiellen Apoptose von  $\beta$ -Zellen. Dies hätte damit sogar negative Folgen für Diabetiker. Weiterhin konnte gezeigt werden dass ein CK2-„knockout“ in Mäusen zu einer embryonalen Letalität führt [81, 92]. Eine Veränderung des Proteoms in einer murinen Myoblasten Zelllinie (C2C12) konnte ebenfalls beobachtet werden [179]. Außerdem würde die Transfektion eines CRISPR/Cas-System nur einen Teil der Zellen erreichen. Beim Einsatz von Hemmstoffen hingegen wird die CK2 der gesamte Zellpopulation inhibiert. Des Weiteren können Hemmstoffe leichter als Therapeutikum eingesetzt werden. Durch *in vitro* GST pull-down Experimente konnte ich zeigen, dass die beiden GST-Fusionsproteine (GST- $\text{Ca}_v2.1$  (1666-1738) und GST- $\text{Ca}_v2.1$  (2177-2369)) nicht nur Substrate der CK2 *in vitro* darstellen,

sondern auch Interaktionspartner der CK2 *in vitro* sind. Die Untersuchungen zeigten eine Bindung der Fusionsproteine an beide Untereinheiten der CK2 (CK2 $\alpha$  und CK2 $\beta$ ). In weiteren Interaktionsanalysen konnte demonstriert werden, dass auch die Einzelmутanten S2362G und S2364A sowie die Doppelmутante S2362A/S2364A sowohl an beide Untereinheiten der CK2 binden. Dies zeigt, dass die Bindung und Phosphorylierung von Ca $_v$ 2.1 durch die CK2 unabhängig voneinander stattfinden. Die Proteinkinase CK2 bindet an ihre Substrate mit der Substrat-Bindedomäne ihrer katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit. Dass diese Untereinheit auch alleine in der Lage ist das Ca $_v$ 2.1 Protein *in vitro* zu phosphorylieren, konnte ich in der vorliegenden Arbeit zeigen. Eine Bindung der CK2 $\alpha$ -Untereinheit an die GST-Fusionsproteine war somit zu erwarten. Die CK2 $\beta$ -Untereinheit dient dazu, die katalytische Aktivität sowie die Substratspezifität der CK2 zu regulieren [72]. Des Weiteren interagiert die CK2 $\beta$ -Untereinheit auch unabhängig von der CK2 $\alpha$  mit anderen Serin/Threonin-Kinasen wie zum Beispiel A-Raf [180], Chk1 [80] oder c-Mos [77] und moduliert die Funktion von diesen. Möglich ist, dass die Bindung der CK2 $\beta$  an Ca $_v$ 2.1 unter anderem dazu dient auch andere Substrate zu phosphorylieren. Mittels Coimmunpräzipitationsuntersuchungen mit Gesamtzellextrakten konnte die Bindung des Ca $_v$ 2.1 Proteins an die CK2 $\alpha$ -Untereinheit auch *in vivo* in den INS-1 832/13 Zellen bestätigt werden. Dass eine Interaktion damit auch in den Zellen selbst stattfindet, unterstützt das zuvor gezeigte Ergebnis einer möglichen Phosphorylierung des endogenen Ca $_v$ 2.1 durch die CK2 und deutet auf eine tatsächliche Phosphorylierung *in vivo* in pankreatischen Zellen hin. In vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe Montenarh konnte gezeigt werden, dass Glucose einen Einfluss auf die Bindung der CK2 an Substrate hat [121]. Bei einer Behandlung der INS-1 832/13 Zellen mit Konzentrationen von 0 mM und 10 mM Glucose bindet Ca $_v$ 2.1 jedoch unabhängig von der Glucosekonzentration an die CK2.

Nach einer Hemmung der CK2 konnte ein erhöhter Proteingehalt von endogenem Ca $_v$ 2.1 Protein festgestellt werden. Insbesondere nach einer 24-stündigen Behandlung mit CX-4945 ist die Ca $_v$ 2.1 Proteinexpression signifikant erhöht. Die erhöhte Proteinmenge könnte mit einer Hemmung der Phosphorylierung von anderen CK2-Substraten zusammenhängen, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, welche dann zu einer Verstärkung der Expression von Ca $_v$ 2.1 führen. Dieses Ergebnis ist allerdings mit Vorsicht zu betrachten, da wie zuvor gezeigt, nach 24-stündiger CK2-Hemmung eine deutliche Apoptose-Induktion stattfindet. Wird die Proteinmenge von Ca $_v$ 2.1 nach einer Hemmung der CK2 erhöht, so sollte sie im Umkehrschluss bei einer CK2-Überexpression verringert werden. Durch eine Transfektion der katalytischen CK2 $\alpha$ -Untereinheit konnte zwar in die INS-1 832/13 Zellen transfiziert werden, eine Veränderung der Proteinmenge von Ca $_v$ 2.1 konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die Transfektionseffizienz könnte dabei einen kritischen Punkt darstellen. Möglicherweise konnten nicht genügend Zellen eines Ansatzes transfiziert werden, um eine

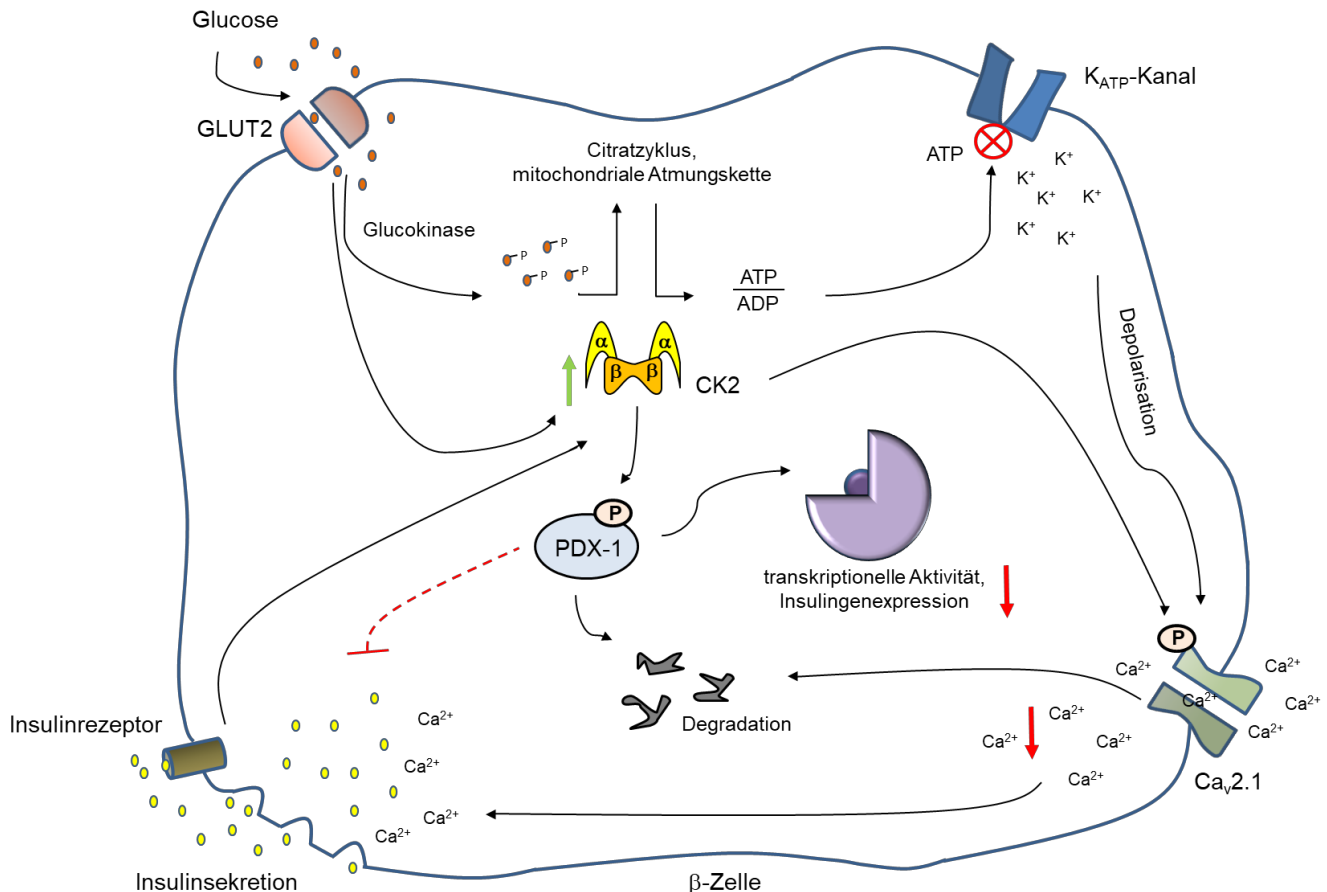
Veränderung der Ca<sub>v</sub>2.1 Proteinmenge zu bewirken. Die Stabilität von Substraten der CK2 kann durch ihre Phosphorylierung beeinflusst werden [154, 181]. Beispielsweise wird die Stabilität von PDX-1 durch eine fehlende CK2-Phosphorylierung erhöht [119]. Dies konnte ebenfalls für das Ca<sub>v</sub>2.1 Protein festgestellt werden. Auch bei Ca<sub>v</sub>2.1 führt die Hemmung der CK2 zu einer Erhöhung der Stabilität des Proteins. Nach einer gleichzeitigen Hemmung der Proteinbiosynthese und der CK2-Aktivität war die durch Extrapolation erhaltene Halbwertszeit des Ca<sub>v</sub>2.1 Proteins deutlich verlängert ( > 15 h) im Vergleich zur Kontrolle (12 h). Fu et al. [182] konnten hingegen bei Transfektionsexperimenten mit dem humanen Ca<sub>v</sub>2.1 in HEK293T Zellen eine Halbwertszeit von ca. acht Stunden für den Kanal beobachten. Die Unterschiede in den Halbwertszeiten könnten durch die unterschiedlichen Zelllinien bedingt sein. Da HEK293T-Zellen keine endogenen Ca<sub>v</sub>-Kanäle exprimieren [183] und ich in dieser Arbeit die Halbwertszeit des endogenen Kanals untersucht habe, können sich auch daraus Unterschiede ergeben. Es gibt Hinweise darauf, dass das De-/Ubiquitinierungs-Gleichgewicht die Anzahl an Kanälen, die in der Plasmamembran exprimiert werden, reguliert [155]. Durch eine Inhibition des Proteasoms mit MG132 (5 µM) über neun Stunden konnten allerdings keine Unterschiede in der Proteinmenge von Ca<sub>v</sub>2.1 festgestellt werden. Auch eine gleichzeitige Hemmung der CK2 zeigte keinen Unterschied verglichen zur Kontrolle. Die Arbeitsgruppe um Fu et al. [182] hingegen konnten nach einer Inhibition des Proteasoms über 24 Stunden zeigen, dass die Proteinmenge von Ca<sub>v</sub>2.1 deutlich erhöht ist. Möglicherweise ist ein Behandlungszeitraum von neun Stunden zu kurz, um Veränderungen der Proteinmenge zu beobachten. Eine Inhibition des Proteasoms über neun Stunden hinaus war jedoch nicht möglich, da nach diesem Zeitpunkt keine lebenden Zellen mehr vorhanden waren. Auch wurden die Untersuchungen in der Arbeitsgruppe um Fu et al. [182] mit einer Transfektion des humanen Ca<sub>v</sub>2.1 in HEK293T-Zellen durchgeführt, wodurch sich ebenfalls Unterschiede bezüglich des Abbaus ergeben können. In weiteren Analysen wäre es sinnvoll, die Ubiquitinierung des Ca<sub>v</sub>2.1 Proteins nach Proteasom-Hemmung bzw. Inhibition der CK2 innerhalb von neun Stunden näher zu untersuchen. Eine Polyubiquitinierung könnte ein Signal für die Proteindegradation darstellen, und es wäre interessant zu untersuchen, ob es im Vergleich zu einer Kontrolle Unterschiede in der Ubiquitinierung des Ca<sub>v</sub>2.1 Proteins nach einer Hemmung des CK2 gibt.

In der vorliegenden Dissertation konnte durch einen „knockdown“ des Ca<sub>v</sub>2.1 Kanals erstmals gezeigt werden, dass der im Vergleich zur Kontrolle bei CK2-Hemmung beobachtete Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Ionenkonzentration durch einen Influx über den Ca<sub>v</sub>2.1 Kanal bedingt ist. Aus den Daten von siRNA Experimenten geht hervor, dass durch eine Reduktion der Ca<sub>v</sub>2.1 Proteinmenge um 45% dieser Anstieg fast vollständig unterbunden wurde. Der Verlauf der Kurve der F340/380 Ratio Werte ist nach Reduktion der Ca<sub>v</sub>2.1 Proteinmenge bei einer Hemmung der CK2 nur noch minimal im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Die verbleibende Erhöhung kann verschiedene Gründe haben. Zum einen könnte die Reduktion der Ca<sub>v</sub>2.1



Proteinmenge nicht ausreichend sein, um den Anstieg vollständig zu unterbinden. Zum anderen könnte eine Hemmung der CK2 auch andere Calciumkanäle beeinflussen, welche dann natürlich nicht durch den „knockdown“ des  $\text{Ca}_v2.1$  Kanals betroffen sind. Allerdings würden diese Kanäle dann nur einen kleinen Teil zu dem durch CK2-Hemmung bedingten Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration beitragen und wären sehr wahrscheinlich nicht verantwortlich für den durch Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration bedingten Anstieg der Insulinsekretion. Die durch die siRNA Experimente erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die Inhibition der CK2 ein negativ regulatorischer Effekt der CK2 auf  $\text{Ca}_v2.1$  unterbunden wird. Dies führt zu einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration, wodurch wiederum die Insulinsekretion erhöht wird. Die Insulinsekretion kann durch den Neurotransmitter Acetylcholin über die Aktivierung des muskarinischen  $\text{M}_3$ -Acetylcholinrezeptor stimuliert werden [123]. Dieser stellt ebenfalls ein Substrat für die CK2 dar [125]. Die Arbeitsgruppe um Rossi et al. [122] haben gezeigt, dass die CK2 über den  $\text{M}_3\text{R}$ -Signalweg in pankreatischen murinen MIN6 Zellen eine negative Regulation auf die Insulinsekretion ausübt. Bei Ihren Studien haben sie die Beobachtung gemacht, dass die GSIS bei einer Hemmung der CK2 auch in Abwesenheit von Acetylcholin erhöht ist und haben die Hypothese aufgestellt, dass dies möglicherweise durch die Inhibition der Phosphorylierung anderer CK2-Substrate bedingt. Zieht man die in der vorliegenden Dissertation erhaltenen Ergebnisse in Betracht so könnte der  $\text{Ca}_v2.1$  Kanal eines dieser Substrate für die Proteinkinase CK2 darstellen.

In der Abbildung 44 sind die bisher gewonnenen Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit und die hypothetische Einordnung in die bisherigen Beobachtungen zur Rolle der CK2 im Insulinsignalweg zusammengefasst.



**Abbildung 44: Einordnung der gewonnen Erkenntnisse in die bisherigen Beobachtungen zur Rolle der CK2 in pankreatischen  $\beta$ -Zellen.** Der grüne Pfeil zeigt einen stimulatorischen Effekt an, der rote Pfeil einen inhibitorischen Effekt. Die schwarzen Pfeile zeigen die Verbindungswege an.

Steigt die Konzentration von Glukose im Blut über eine Konzentration von 7 mM so wird sie über den GLUT2 Transporter in die  $\beta$ -Zellen transportiert [3, 8, 9]. Dort wird die Glukose durch die Glukokinase phosphoryliert und im Citratzyklus und in der mitochondrialen Atmungskette weiter verstoffwechselt, wodurch das ATP/ADP-Verhältnis steigt [11, 12]. Dadurch kommt es zu einer Schließung von ATP-sensitiven  $K^+$ -Kanälen ( $K_{ATP}$ ) [2, 13], was zur Entstehung eines Membranpotentials führt [9]. Dadurch werden wiederum spannungsabhängige Calciumkanäle, wie der  $Ca_v2.1$  geöffnet und Calcium strömt in die Zelle ein. Die ansteigende intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Ionenkonzentration stimuliert dann die Freisetzung von Insulin [11–14]. Die in die  $\beta$ -Zelle aufgenommene Glukose führt aber auch zu einer gesteigerten Kinaseaktivität der CK2, ohne dabei die Proteinmenge der Kinase zu verändern [121]. Die CK2 phosphoryliert sowohl den Transkriptionsfaktor PDX-1 als auch den  $Ca_v2.1$  Kanal. Dabei unterdrückt die CK2-Phosphorylierung von PDX-1 dessen verstärkende transkriptionelle Aktivität auf die Insulingenexpression [97]. Die Phosphorylierung von  $Ca_v2.1$  führt zu einer Reduktion des

$\text{Ca}^{2+}$ -Influx über den Kanal und verringert dadurch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration und konsekutiv die Insulinsekretion. Durch Insulin wird die CK2-Kinaseaktivität erhöht, was zu einem negativen „feedback“ des Insulins auf die Insulinsekretion führt [120, 184]. Darüber hinaus destabilisiert die Phosphorylierung durch die CK2 das PDX-1 und das  $\text{Ca}_v2.1$  Protein. Der exakte Regulationsmechanismus der CK2, und wie ihre Aktivität wieder herunterreguliert wird, bleibt dabei weiterhin unklar. Eine Möglichkeit ist die Regulation der Kinase über Modifikationen wie zum Beispiel Phosphorylierung [184].

Die CK2-Phosphorylierung des  $\text{Ca}_v2.1$  übt einen inhibitorischen Effekt auf den Kanal aus. Für den L-Typ-Calciumkanal hingegen wurde gezeigt, dass die CK2-Phosphorylierung eine Inhibition durch den C-Terminus des Kanals aufhebt und so dessen Aktivität stimuliert [67, 174]. Der L-Typ Kanal spielt in den humanen pankreatischen  $\beta$ -Zellen eher eine Rolle bei der Generierung des Aktionspotentials und der  $\text{Ca}_v2.1$  Kanal bei der Exozytose der insulinhaltigen Vesikel [34].  $\text{Ca}_v2.1$  interagiert direkt mit SNARE Proteinen über eine Synprint (synaptic protein interaction) Seite, die in dem intrazellulären „loop“ zwischen den Segmenten 2 und 3 liegt [185]. Die Interaktion von SNARE Proteinen mit spannungsabhängigen Calciumkanälen wurde auch für andere Typen von Kanälen beschrieben und ist  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig [186]. Außerdem wird die Interaktion unter anderem inhibiert durch Phosphorylierungen von PKC und CaMKII [187]. Denkbar wäre, dass die CK2-Phosphorylierung die SNARE Interaktion mit dem  $\text{Ca}_v2.1$  Kanal indirekt über den  $\text{Ca}^{2+}$  Influx reguliert und somit eine Art Schalter für das Öffnen oder Schließen des Kanals darstellt. Die in der vorliegenden Dissertation gewonnenen Erkenntnisse unterstützen die Beobachtungen, dass die CK2 eine wichtige Rolle bei der Insulinbiosynthese und -sekretion in pankreatischen  $\beta$ -Zellen ausübt. Es sollten allerdings weitere Untersuchungen, insbesondere bezüglich der *in vivo* Phosphorylierung von  $\text{Ca}_v2.1$  und deren Funktion durch die CK2, erfolgen. Wie ich zuvor gezeigt habe, binden die GST-Fusionsproteine Fusionsproteine (GST- $\text{Ca}_v2.1$  (1666-1738) und GST- $\text{Ca}_v2.1$  (2177-2369)) unabhängig von der Phosphorylierung an die CK2 $\beta$ -Untereinheit. Die CK2 $\beta$ -Untereinheit ist in der Lage, auch unabhängig von der katalytischen CK2 $\alpha$ -Untereinheit mit anderen Serin/Threonin Kinasen zu interagieren und die Funktionen dieser Kinasen zu modulieren [77, 80, 180]. Durch die Bindung von CK2 $\beta$  an  $\text{Ca}_v2.1$  könnten so möglicherweise andere Kinase beeinflusst werden. Untersuchungen bezüglich dieser Hypothese wären von Interesse. In weiteren Analysen wäre es auch sinnvoll die Insulinsekretion und die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration unter Hochglucosebedingungen zu analysieren, um etwaige Veränderungen im Vergleich zu der in der Arbeit gewählten Glucosekonzentration zu beobachten. Im Anschluss an die Untersuchungen in der INS-1 832/13 Zelllinie sollten die gewonnen Erkenntnisse im lebenden Organismus überprüft werden.

Der CK2-Hemmstoff CX-4945 wird bereits als Therapeutikum in der Tumorthherapie eingesetzt [148]. Auch für die Behandlung von Typ 2 Diabetes mellitus würden CK2-Inhibitoren als potentielle Therapeutika in Frage kommen. Durch eine Hemmung der CK2 könnte die  $\text{Ca}_v2.1$ -Aktivität erhöht werden, wodurch eine Stimulation der Insulinbiosynthese und -sekretion erzielt würde. Die Klärung der genauen Umstände dieser Stimulation durch CK2-Hemmung und somit auch die Identifikation weiterer CK2-Zielmoleküle in der Insulinbiosynthese bzw. -sekretion ist damit aus biologischer und medizinischer Sicht von großem Interesse.

Bei Immundetektionsanalysen des  $\text{Ca}_v2.1$  Proteins fiel eine Proteinbande bei ca. 100 kDa auf. Nach einer 24-stündigen Hemmung der CK2 war der Proteingehalt dieses Proteins signifikant reduziert. Im Vergleich dazu war die Proteinmenge von  $\text{Ca}_v2.1$  signifikant erhöht. Auch hier muss das Ergebnis unter Berücksichtigung der Apoptose-Induktion nach einer 24-stündigen Inhibition der CK2 betrachtet werden. Jedoch ist eine solche Reduktion des Proteingehaltes nach einer CK2-Hemmung äußerst spannend. Deshalb habe ich das 100 kDa Protein im Rahmen meiner Dissertation näher betrachtet. Der bei der Immundetektion von  $\text{Ca}_v2.1$  verwendete Antikörper erkennt eine 100 Aminosäuren lange Sequenz im C-Terminus des humanen  $\text{Ca}_v2.1$  (<https://www.abcam.com/cacna1a-antibody-epr4458n-ab181371.html>) und ist ebenfalls für die Spezies Maus (96% Übereinstimmung) und Ratte (98% Übereinstimmung) geeignet. Zur Überprüfung ob die Sequenz möglicherweise in anderen Proteinen vorkommen könnte, wurde die Sequenz geblastet ([www.blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov)). Die Suche ergab nur Übereinstimmungen mit dem  $\text{Ca}_v2.1$  Protein. Ein Antikörper benötigt für die Erkennung eines Proteins im Generellen nur 5-10 AS. Daher ist es trotz fehlender Übereinstimmung mit anderen Sequenzen möglich, dass der Antikörper ein anderes Protein erkennt. Aber möglicherweise stellt das 100 kDa Protein auch einen Teil des C-Terminus von  $\text{Ca}_v2.1$  dar. Durch ein Peptidkompetitionsassays konnte gezeigt werden, dass der Antikörper spezifisch für das  $\text{Ca}_v2.1$  Protein ist, wobei die 100 kDa Proteinbande noch schwach durch den mit „Blocking-Peptid“ behandelten Antikörper erkannt wurde und daher keine eindeutige Zuordnung möglich war. Die Arbeitsgruppe um Du et al. [188] hat beschrieben, dass die humane  $\text{Ca}_v2.1$  mRNA mittels einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) für zwei Proteine codiert: den  $\text{Ca}_v2.1$  Calciumionenkanal und einen Transkriptionsfaktor der aus dem C-Terminus von  $\text{Ca}_v2.1$  besteht (75 kDa). Durch siRNA Experimente wurde untersucht, inwiefern die Proteinmenge des 100 kDa Proteins beeinflusst wird. Sollte es sich um den beschriebenen Transkriptionsfaktor handeln, so sollte dieser in gleichem Umfang reduziert werden wie  $\text{Ca}_v2.1$ . Die Reduktion der Proteinmenge des 100 kDa Proteins war zwar signifikant (20%), jedoch deutlich geringer als die des Volllängen  $\text{Ca}_v2.1$  Proteins (55%). Dies spricht eher gegen die Hypothese, dass eine bicistronische mRNA für das 100 kDa Protein verantwortlich ist. Möglicherweise handelt es sich bei der Reduktion auch um einen

OFF-Target Effekt. Es wäre aber auch möglich, dass das Protein generell sehr stabil in der Zelle vorliegt. Dies konnte durch Inhibition der Proteinbiosynthese mit Cycloheximid bestätigt werden. Nach neun Stunden war die Proteinmenge des 100 kDa Proteins um nur ca. 30% reduziert. Eine Hemmung der CK2 zeigte über diesen Zeitraum keine Beeinflussung der Stabilität des Proteins. Auch bei einer Hemmung des Proteasoms konnte kein Unterschied zwischen einer CK2-Hemmung und der Kontrolle ohne eine Inhibition der CK2 festgestellt werden. Ob das Protein über das Proteasom abgebaut wird, konnte innerhalb eines Behandlungszeitraums von neun Stunden nicht festgestellt werden. Des Weiteren hat die Arbeitsgruppe um Du et al. [188] durch Experimente mit PC12 Zellen (Zelllinie aus einem Tumor des Ratten Nebennierenmarks) gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor unter anderem die Expression von GRN (granulin), BTG1 (B-cell translation gene 1) und PMCA2 (Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) erhöht. PMCA2 ist ein Transportprotein in der Plasmamembran von Zellen und sorgt dafür, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus der Zelle entfernt werden. In der vorliegenden Dissertation habe ich gezeigt, dass intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration in der  $\beta$ -Zelle nach einer Hemmung der CK2 im Vergleich zur Kontrolle erhöht ist. Die Proteinmenge des 100 kDa Proteins ist nach einer CK2-Hemmung signifikant reduziert. Sollte es sich bei diesem Protein um den Transkriptionsfaktor handeln, so wäre möglicherweise auch die Expression der PMCA2 reduziert, was gegebenenfalls einen geringeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux zur Folge hätte. Dies wiederum würde mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmen.

Bei einer Größe von 250 kb und bis zu 50 Exons ist es nicht verwunderlich, dass eine Vielzahl von Splicevarianten mit unterschiedlichen Phänotypen [30, 32, 189–191], und auch möglicherweise bislang noch unidentifizierte Splicevarianten von  $\text{Ca}_v2.1$  existieren. Allerdings sind bis jetzt nur Splicevarianten beschrieben, die einen verkürzten oder fehlenden C-Terminus besitzen. Der Antikörper erkennt aber eine 100 Aminosäuren lange Sequenz im C-Terminus des humanen  $\text{Ca}_v2.1$ . Daher ist es eher unwahrscheinlich, dass das 100 kDa Protein einer Splicevariante von  $\text{Ca}_v2.1$  entspricht. Des Weiteren wurde in Studien die Beobachtung eines 60-75 kDa Fragmentes des  $\text{Ca}_v2.1$  gemacht, welches eine toxische Wirkung hat, und auf eine proteolytische Spaltung des C-Terminus zurück geführt wird [192, 193]. Die verantwortliche Protease konnte jedoch nicht identifiziert werden. Außerdem gibt es mehrere Mutationen, die ebenfalls zu unterschiedlichen  $\text{Ca}_v2.1$  Protein Formen führen können [31, 194, 195]. Somit kommen mehrere mögliche Erklärungen für die Identität des 100 kDa Proteins in Frage.

Durch Immundetektionsanalysen von Gesamtzellextrakten nach CK2-Hemmung mit einem CK2-Phosphosubstrat Antikörper konnte ein erster Hinweis auf eine mögliche Phosphorylierung des 100 kDa Proteins durch die CK2 erlangt werden. Um die Identität des Proteins endgültig zu klären sind jedoch weitere Analysen notwendig. Zunächst sollte eine Immundetektion mit Hilfe eines zweiten  $\text{Ca}_v2.1$  Antikörpers, der gegen den C-Terminus

gerichtet ist, durchgeführt werden, um das Ergebnis des ersten Antikörpers zu bestätigen. Eine qRT-PCR Analyse wäre ebenfalls sinnvoll. Dazu sollten sowohl Primer für den N-Terminus von  $\text{Ca}_v2.1$  als auch für den C-Terminus von  $\text{Ca}_v2.1$  verwendet werden. Ist nur der  $\text{Ca}_v2.1$  Volllängenkanal vorhanden, so sollte die Menge an erhaltenem Produkt gleich sein. Entspricht das 100 kDa Protein dem C-Terminus von  $\text{Ca}_v2.1$ , so sollte die Menge an erhaltenem Produkt bei der Probe mit dem C-Terminus Primer größer sein. Des Weiteren wären Protease-Inhibitionsstudien von Interesse. Zur endgültigen Identifikation könnte eine *de novo*-Peptidsequenzierung per Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) mit vorangeschalteter 2D-Gelelektrophorese durchgeführt werden. Dabei erfolgt eine zweite Fragmentierung der Peptide. Dadurch werden aus jedem Fragment der ersten Runde noch kleinere Fragmente erhalten, die durch Ihre Überlappungen die Peptidsequenz ergeben. Anschließend sollten Funktionsanalysen des Proteins folgen. Die Identifikation der 100 kDa Proteinbande und deren Funktion ist eine spannende neue Fragestellung auch im Hinblick auf eine mögliche Interaktion mit dem  $\text{Ca}_v2.1$ -Kanal und einer Beteiligung der CK2.

## 8. Literaturverzeichnis

- [1] D. A. Stoffers, M. K. Thomas, and J. F. Habener, "Homeodomain protein IDX-1: A master regulator of pancreas development and insulin gene expression," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 8, pp. 145–151, 1997.
- [2] P. V. Röder *et al.*, "Pancreatic regulation of glucose homeostasis," *Exp. Mol. Med.*, vol. 48, p. e219, 2016.
- [3] M. Skelin, M. Rupnik, and A. Cencic, "Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research," *ALTEX*, vol. 27, pp. 105–113, 2010.
- [4] A. A. Elayat, M. M. El-Naggar, and M. Tahir, "An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets.," *J. Anat.*, vol. 186, pp. 629–637, 1995.
- [5] B. Göke, "Islet cell function:  $\alpha$  and  $\beta$  cells - partners towards normoglycaemia," *Int. J. Clin. Pract.*, vol. 159, pp. 2–7, 2008.
- [6] L. Freychet *et al.*, "Effect of intranasal glucagon on blood glucose levels in healthy subjects and hypoglycaemic patients with insulin-dependent diabetes," *Lancet*, vol. 331, pp. 1364–1366, 1988.
- [7] A. H. Khan and J. E. Pessin, "Insulin regulation of glucose uptake: A complex interplay of intracellular signalling pathways," *Diabetologia*, vol. 45, pp. 1475–1483, 2002.
- [8] L. J. McCulloch *et al.*, "GLUT2 (SLC2A2) is not the principal glucose transporter in human pancreatic beta cells: Implications for understanding genetic association signals at this locus," *Mol. Genet. Metab.*, vol. 104, pp. 648–653, 2011.
- [9] M. Velasco *et al.*, "Modulation of Ionic Channels and Insulin Secretion by Drugs and Hormones in Pancreatic Beta Cells," *Mol. Pharmacol.*, vol. 90, pp. 341–357, 2016.
- [10] H. Kaneto and T. Matsuoka, "Role of Pancreatic Transcription Factors in Maintenance of Mature  $\beta$ -Cell Function," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, pp. 6281–6297, 2015.
- [11] G. Drews, P. Krippeit-Drews, and M. Düfer, "Electrophysiology of Islet Cells," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 654, pp. 115–163, 2010.
- [12] M. Hiriart and L. Aguilar-Bryan, "Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic  $\beta$ -cell," *Am. J. Physiol. Metab.*, vol. 295, pp. E1298–E1306, 2008.
- [13] H. Demirbilek *et al.*, "Ion Transporters , Channelopathies , and Glucose Disorders," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, p. E2590, 2019.
- [14] F. M. Ashcroft and P. Rorsman, "Electrophysiology of the pancreatic  $\beta$ -cell," *Prog.*

*Biophys. Mol. Biol.*, vol. 54, pp. 87–143, 1989.

- [15] S. Shao *et al.*, “Transcription factors involved in glucose-stimulated insulin secretion of pancreatic beta cells,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 384, pp. 401–404, 2009.
- [16] F. Al-Quobaili and M. Montenarh, “Pancreatic duodenal homeobox factor-1 and diabetes mellitus type 2,” *Int. J. Mol. Med.*, vol. 21, pp. 399–404, 2008.
- [17] J. M. W. Slack, “Developmental biology of the pancreas,” *Development*, vol. 121, pp. 1569–1580, 1995.
- [18] R. A. DeFronzo, “Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus,” *Med. Clin. North Am.*, vol. 88, pp. 787–835, 2004.
- [19] W. A. Catterall, “Structure and regulation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 16, pp. 521–555, 2000.
- [20] T. Tanabe *et al.*, “Structure and function of voltage-dependent calcium channels from muscle,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 707, pp. 81–86, 1993.
- [21] S. Misler *et al.*, “Electrophysiology of stimulus-secretion coupling in human  $\beta$ -cells,” *Diabetes*, vol. 41, pp. 1221–1228, 1992.
- [22] V. Navarro-Tableros *et al.*, “Nerve growth factor promotes development of glucose-induced insulin secretion in rat neonate pancreatic beta cells by modulating calcium channels,” *Channels*, vol. 1, pp. 408–416, 2007.
- [23] S. N. Yang *et al.*, “Ionic mechanisms in pancreatic  $\beta$  cell signaling,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 71, pp. 4149–4177, 2014.
- [24] Y. Zhou *et al.*, “Inhibition of calcium influx reduces dysfunction and apoptosis in lipotoxic pancreatic  $\beta$ -cells via regulation of endoplasmic reticulum stress,” *PLoS One*, vol. 10, p. e0132411, 2015.
- [25] R. W. Tsien, P. T. Ellinor, and W. A. Horne, “Molecular diversity of voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels,” *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 12, pp. 349–354, 1991.
- [26] K. Abele and J. Yang, “Regulation of voltage-gated calcium channels by proteolysis,” *Sheng Li Xue Bao*, vol. 64, pp. 504–514, 2012.
- [27] W. A. Catterall, “Voltage-gated calcium channels,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, p. a003947, 2011.
- [28] R. Felix, A. Caldéron-Rivera, and A. Andrade, “Regulation of high-voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channel function, trafficking, and membrane stability by auxiliary subunits,” *Wiley*



- Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.*, vol. 2, pp. 207–220, 2013.
- [29] S. Geisler, C. L. Schöpf, and G. J. Obermair, “Emerging evidence for specific neuronal functions of auxiliary calcium channel  $\alpha 2\delta$  subunits,” *Gen. Physiol. Biophys.*, vol. 34, pp. 105–118, 2015.
  - [30] S. N. Yang and P. O. Berggren, “The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic  $\beta$ -cell physiology and pathophysiology,” *Endocr. Rev.*, vol. 27, pp. 621–676, 2006.
  - [31] R. A. Ophoff *et al.*, “Familial Hemiplegic Migraine and Episodic Ataxia Type-2 Are Caused by Mutations in the  $\text{Ca}^{2+}$  Channel Gene CACNL1A4,” *Cell*, vol. 87, pp. 543–552, 1996.
  - [32] D. Lipscombe, J. Q. Pan, and A. C. Gray, “Functional diversity in neuronal voltage-gated calcium channels by alternative splicing of  $\text{Cav}\alpha 1$ ,” *Mol. Neurobiol.*, vol. 26, pp. 21–44, 2002.
  - [33] S. N. Yang and P. O. Berggren, “ $\beta$ -Cell Cav channel regulation in physiology and pathophysiology,” *Am. J. Physiol. Metab.*, vol. 288, pp. E16–28, 2005.
  - [34] M. Braun *et al.*, “Voltage-gated ion channels in human pancreatic  $\beta$ -Cells : Electrophysiological characterization and role in insulin secretion,” *Diabetes*, vol. 57, pp. 1618–1628, 2008.
  - [35] P. Rorsman, M. Braun, and Q. Zhang, “Regulation of calcium in pancreatic  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells in health and disease,” *Cell Calcium*, vol. 51, pp. 300–308, 2012.
  - [36] B. Ligon, A. E. Boyd, and K. Dunlap, “Class A calcium channel variants in pancreatic islets and their role in insulin secretion,” *J. Biol. Chem.*, vol. 273, pp. 13905–13911, 1998.
  - [37] P. Rorsman and E. Renström, “Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells,” *Diabetologia*, pp. 1029–1045, 2003.
  - [38] V. Magnelli *et al.*, “Down-regulation of non-L-, non-N-type (Q-like)  $\text{Ca}^{2+}$  channels by Lambert-Eaton myasthenic syndrome (LEMS) antibodies in rat insulinoma RINmSF cells,” *FEBS Lett.*, vol. 387, pp. 47–52, 1996.
  - [39] A. Pereverzev *et al.*, “Reduction of insulin secretion in the insulinoma cell line INS-1 by overexpression of a  $\text{Cav}2.3$  ( $\alpha 1\text{E}$ ) calcium channel antisense cassette,” *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 146, pp. 881–889, 2002.
  - [40] E. Sher *et al.*, “Voltage-operated calcium channel heterogeneity in pancreatic  $\beta$  cells:

- Physiopathological implications," *J. Bioenerg. Biomembr.*, vol. 35, pp. 687–696, 2003.
- [41] E. Takahashi, N. Miyamoto, and T. Nagasu, "Analysis of the 5'-upstream region of mouse P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha(1A)$  subunit gene for expression in pancreatic islet  $\beta$  cells using transgenic mice and HIT-T15 cells," *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 24, pp. 225–232, 2000.
- [42] A. Horváth *et al.*, "Voltage dependent calcium channels in adrenal glomerulosa cells and in insulin producing cells," *Cell Calcium*, vol. 23, pp. 33–42, 1998.
- [43] K. Jun *et al.*, "Ablation of P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the  $\alpha 1A$ -subunit," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 96, pp. 15245–15250, 1999.
- [44] Y. Takiyama *et al.*, "A Japanese family with spinocerebellar ataxia type 6 which includes three individuals homozygous for an expanded CAG repeat in the SCA6/CACNL1A4 gene," *J. Neurol. Sci.*, vol. 158, pp. 141–147, 1998.
- [45] M. Velasco *et al.*, "Metabolic syndrome induces changes in  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -channels and calcium currents in pancreatic  $\beta$ -cells," *Islets*, vol. 4, pp. 302–311, 2012.
- [46] S. Kato *et al.*, "Alterations in basal and glucose-stimulated voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel activities in pancreatic  $\beta$  cells of non-insulin-dependent diabetes mellitus GK rats," *J. Clin. Invest.*, vol. 97, pp. 2417–2425, 1996.
- [47] C. Ämmälä, F. M. Ashcroft, and P. Rorsman, "Calcium-independent potentiation of insulin release by cyclic AMP in single  $\beta$ -cells," *Nature*, vol. 363, pp. 356–358, 1993.
- [48] L. Huang *et al.*, " $[\text{Ca}^{2+}]_i$  regulates trafficking of Cav1.3 ( $\alpha 1D$   $\text{Ca}^{2+}$  channel) in insulin-secreting cells," *Am. J. Physiol. Physiol.*, vol. 286, pp. 213–221, 2004.
- [49] L. Juntti-berggren *et al.*, "Apolipoprotein CIII promotes  $\text{Ca}^{2+}$  -dependent  $\beta$  cell death in type 1 diabetes," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, pp. 10090–10094, 2004.
- [50] L. Juntti-Berggren *et al.*, "Increased activity of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels exposed to serum from patients with type I diabetes," *Science*, vol. 261, pp. 86–90, 1993.
- [51] J. Lazniewska and N. Weiss, "The 'Sweet' Side of Ion Channels," *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, vol. 167, pp. 67–114, 2014.
- [52] C. Ämmälä *et al.*, "Activation of protein kinases and inhibition of protein phosphatases play a central role in the regulation of exocytosis in mouse pancreatic  $\beta$  cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 91, pp. 4343–4347, 1994.
- [53] A. T. R. Sim *et al.*, "The role of serine/threonine protein phosphatases in exocytosis,"

- Biochem. J.*, vol. 373, pp. 641–659, 2003.
- [54] T. J. Kamp and W. J. Hell, "Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C," *Circ. Res.*, vol. 87, pp. 1095–1102, 2000.
  - [55] K. S. De Jongh *et al.*, "Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the  $\alpha 1$  subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate- dependent protein kinase," *Biochemistry*, vol. 35, pp. 10392–10402, 1996.
  - [56] S. I. Walaas and P. Greengard, "Protein phosphorylation and neuronal function," *Pharmacol. Rev.*, vol. 43, pp. 299–349, 1991.
  - [57] W. Osterrieder *et al.*, "Injection of subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase into cardiac myocytes modulates  $\text{Ca}^{2+}$  current," *Nature*, vol. 298, pp. 576–578, 1982.
  - [58] D. Armstrong and R. Eckert, "Voltage-activated calcium channels that must be phosphorylated to respond to membrane depolarization," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 84, pp. 2518–2522, 1987.
  - [59] E. I. Rotman, B. J. Murphy, and W. A. Catterall, "Sites of selective cAMP-dependent phosphorylation of the L-type calcium channel  $\alpha 1$  subunit from intact rabbit skeletal muscle myotubes," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, pp. 16371–16377, 1995.
  - [60] R. N. Leach, K. Brickley, and R. I. Norman, "Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates residues in the C-terminal domain of the cardiac L-type calcium channel  $\alpha 1$  subunit," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1281, pp. 205–212, 1996.
  - [61] P. Arkhammar *et al.*, "Protein kinase C modulates the insulin secretory process by maintaining a proper function of the  $\beta$ -cell voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, pp. 2743–2749, 1994.
  - [62] H. Jahn *et al.*, "Site-specific phosphorylation of the purified receptor for calcium-channel blockers by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases, protein kinase C, calmodulin-dependent protein kinase II and casein kinase II," *Eur. J. Biochem.*, vol. 178, pp. 535–542, 1988.
  - [63] T. S. Puri *et al.*, "Differential effects of subunit interactions on protein kinase A- and C-mediated phosphorylation of L-type calcium channels," *Biochemistry*, vol. 36, pp. 9605–9615, 1997.
  - [64] D. McHugh *et al.*, "Inhibition of cardiac L-type calcium channels by protein kinase C phosphorylation of two sites in the N-terminal domain," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*,

vol. 97, pp. 12334–12338, 2000.

- [65] M. A. Emrick *et al.*, “ $\beta$ -adrenergic-regulated phosphorylation of the skeletal muscle  $\text{Ca}_v1.1$  channel in the fight-or-flight response,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, pp. 18712–18717, 2010.
- [66] M. D. Fuller *et al.*, “Molecular mechanism of calcium channel regulation in the fight-or-flight response,” *Sci. Signal.*, vol. 3, pp. 1–19, 2011.
- [67] T. Kashiwara *et al.*, “Angiotensin II activates  $\text{Ca}_v1.2$   $\text{Ca}^{2+}$  channels through  $\beta$ -arrestin2 and casein kinase 2 in mouse immature cardiomyocytes,” *J. Physiol.*, vol. 595, pp. 4207–4225, 2017.
- [68] G. Burnett and E. P. Kennedy, “The enzymatic phosphorylation of proteins,” *J. Biol. Chem.*, vol. 211, pp. 969–980, 1954.
- [69] L. K. Wilson *et al.*, “Casein kinase II catalyzes tyrosine phosphorylation of the yeast nucleolar immunophilin Fpr3,” *J. Biol. Chem.*, vol. 272, pp. 12961–12967, 1997.
- [70] L. A. Pinna, “Casein kinase 2: An ‘eminence grise’ in cellular regulation?,” *BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1054, pp. 267–284, 1990.
- [71] P. J. Roach, “Multisite and hierarchal protein phosphorylation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 266, pp. 14139–14142, 1991.
- [72] D. W. Lichtfield, “Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death,” *Biochem. J.*, vol. 369, pp. 1–15, 2003.
- [73] J. E. Allende and C. C. Allende, “Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation,” *FASEB*, vol. 9, pp. 313–323, 1995.
- [74] B. Boldyreff *et al.*, “Ser2 is the autophosphorylation site in the  $\beta$  subunit from bicistronically expressed human casein kinase-2 and from native rat liver casein kinase-2 $\beta$ ,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 218, pp. 515–521, 1993.
- [75] K. C. Graham and D. W. Litchfield, “The regulatory  $\beta$  subunit of protein kinase CK2 mediates formation of tetrameric CK2 complexes,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, pp. 5003–5010, 2000.
- [76] K. Niefind *et al.*, “Crystal structure of human protein kinase CK2: Insights into basic properties of the CK2 holoenzyme,” *EMBO J.*, vol. 20, pp. 5320–5331, 2001.
- [77] M. Chen *et al.*, “The casein kinase II  $\beta$  subunit binds to Mos and inhibits Mos activity,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 17, pp. 1904–1912, 1997.
- [78] M. Faust *et al.*, “Localization of individual subunits of protein kinase CK2 to the

- endoplasmic reticulum and to the golgi apparatus," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 227, pp. 73–80, 2001.
- [79] O. Filhol *et al.*, "Live-cell fluorescence imaging reveals the dynamics of protein kinase CK2 individual subunits," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, pp. 975–987, 2003.
- [80] B. Guerra, O. G. Issinger, and J. Y. J. Wang, "Modulation of human checkpoint kinase Chk1 by the regulatory  $\beta$ -subunit of protein kinase CK2," *Oncogene*, vol. 22, pp. 4933–4942, 2003.
- [81] D. Y. Lou *et al.*, "The alpha catalytic subunit of protein kinase CK2 is required for mouse embryonic development," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 28, pp. 131–139, 2008.
- [82] G. Stalter *et al.*, "Asymmetric expression of protein kinase CK2 subunits in human kidney tumors," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 202, pp. 141–147, 1994.
- [83] J. Stigare *et al.*, "A majority of casein kinase II alpha subunit is tightly bound to intranuclear components but not to the beta subunit," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 129, pp. 77–85, 1993.
- [84] B. Guerra *et al.*, "Protein kinase CK2: evidence for a protein kinase CK2 $\beta$  subunit fraction, devoid of the catalytic CK2 $\alpha$  subunit, in mouse brain and testicles," *FEBS Lett.*, vol. 462, pp. 353–357, 1999.
- [85] N. Schuster *et al.*, "Regulation of p53 mediated transactivation by the  $\beta$ -subunit of protein kinase CK2," *FEBS Lett.*, vol. 447, pp. 160–166, 1999.
- [86] A. C. Bibby and D. W. Litchfield, "The multiple personalities of the regulatory subunit of protein kinase CK2 : CK2 dependent and CK2 independent roles reveal a secret identity for CK2 $\beta$ ," *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 1, pp. 67–79, 2005.
- [87] L. A. Pinna, "Protein kinase CK2: A challenge to canons," *J. Cell Sci.*, vol. 115, pp. 3873–3878, 2002.
- [88] F. Meggio and L. A. Pinna, "One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2?," *FASEB*, vol. 17, pp. 349–368, 2003.
- [89] K. Niefind *et al.*, "GTP plus water mimic ATP in the active site of protein kinase CK2," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 6, pp. 1100–1103, 1999.
- [90] L. A. Pinna, "The raison d'être of constitutively active protein kinases: The lesson of CK2," *Acc. Chem. Res.*, vol. 36, pp. 378–384, 2003.
- [91] A. Schnitzler *et al.*, "The protein kinase CK2<sup>Andante</sup> holoenzyme structure supports

- proposed models of autoregulation and trans-autophosphorylation," *J. Mol. Biol.*, vol. 426, pp. 1871–1882, 2014.
- [92] T. Buchou *et al.*, "Disruption of the regulatory  $\beta$  subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, pp. 908–915, 2003.
- [93] K. A. Ahmad *et al.*, "Protein kinase CK2 - A key suppressor of apoptosis," *Adv. Enzyme Regul.*, vol. 48, pp. 179–187, 2008.
- [94] C. Götz and M. Montenarh, "Protein kinase CK2 in development and differentiation," *Biomed. Reports*, vol. 6, pp. 127–133, 2017.
- [95] D. E. Hanna, A. Rethinaswamy, and C. V. C. Glover, "Casein kinase II is required for cell cycle progression during G1 and G2/M in *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, pp. 25905–25914, 1995.
- [96] D. W. Litchfield and B. Lüscher, "Casein kinase II in signal transduction and cell cycle regulation," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 127–128, pp. 187–199, 1993.
- [97] R. Meng *et al.*, "CK2 phosphorylation of Pdx-1 regulates its transcription factor activity," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 67, pp. 2481–2489, 2010.
- [98] M. Montenarh, "Protein kinase CK2 in DNA damage and repair," *Transl. Cancer Res.*, vol. 5, pp. 49–63, 2016.
- [99] M. Montenarh, "Protein kinase CK2 and angiogenesis," *Adv. Clin. Exp. Med.*, vol. 23, pp. 153–158, 2014.
- [100] F. Al Quobaili and M. Montenarh, "CK2 and the regulation of the carbohydrate metabolism," *Metabolism*, vol. 61, pp. 1512–1517, 2012.
- [101] L. Schwind *et al.*, "Protein kinase CK2 is necessary for the adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1853, pp. 2207–2216, 2015.
- [102] N. A. St-Denis and D. W. Litchfield, "From birth to death: The role of protein kinase CK2 in the regulation of cell proliferation and survival," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 66, pp. 1817–1829, 2009.
- [103] A. J. Johnson and M. J. Wu, "The new role for an old kinase : Protein kinase CK2 regulates metal ion transport," *Pharmaceuticals*, vol. 9, p. e80, 2016.
- [104] M. S. Zaman *et al.*, "Protein kinase CK2 regulates metal toxicity in neuronal cells," *Metallomics*, vol. 8, pp. 82–90, 2016.

- [105] K. M. Taylor *et al.*, "Cell biology: Protein kinase CK2 triggers cytosolic zinc signaling pathways by phosphorylation of zinc channel ZIP7," *Sci. Signal.*, vol. 5, p. ra11, 2012.
- [106] T. Bachhuber *et al.*, "Regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by the protein kinase CK2," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, pp. 13225–13232, 2008.
- [107] K. A. Ahmad *et al.*, "Targeting CK2 for cancer therapy," *Anticancer. Drugs*, vol. 16, pp. 1037–1043, 2005.
- [108] B. Guerra and O. G. Issinger, "Protein kinase CK2 in human diseases," *Curr. Med. Chem.*, vol. 15, pp. 1870–1886, 2008.
- [109] G. M. Unger *et al.*, "Protein Kinase CK2 as regulator of cell survival: Implications for cancer therapy," *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 4, pp. 77–84, 2004.
- [110] J. W. Slaton *et al.*, "Induction of apoptosis by antisense CK2 in human prostate cancer xenograft model," *Mol. Cancer Res.*, vol. 2, pp. 712–721, 2004.
- [111] W. Pyerin *et al.*, "Catalytic and molecular properties of highly purified phosphotransferase kinase type II from human epithelial cells in culture (HeLa) and relation to ecto protein kinase," *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.*, vol. 368, pp. 215–27, 1987.
- [112] J. Walter *et al.*, "Induced release of cell surface protein kinase yields CK1- and CK2-like enzymes in tandem," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, pp. 111–119, 1996.
- [113] T. Wei and M. Tao, "Human erythrocytes casein kinase II: Characterization and phosphorylation of membrane cytoskeletal proteins," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 307, pp. 206–216, 1993.
- [114] M. Montenarh and C. Götz, "Ecto-protein kinase CK2, the neglected form of CK2," *Biomed. Reports*, vol. 2, pp. 307–313, 2018.
- [115] J. Grande, M. Pérez, and E. Itarte, "Phosphorylation of hepatic insulin receptor by casein kinase 2," *FEBS Lett.*, vol. 232, pp. 130–134, 1988.
- [116] M. J. Tanasijevic *et al.*, "Phosphorylation of the insulin receptor substrate IRS-1 by casein kinase II," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, pp. 18157–18166, 1993.
- [117] A. Haga, Y. Niinaka, and A. Raz, "Phosphohexose isomerase/autocrine motility factor/neuroleukin/maturation factor is a multifunctional phosphoprotein," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1480, pp. 235–244, 2000.
- [118] C. Queiroz-Claret *et al.*, "Time-co-ordinated control of glycogen synthase, protein phosphatase 2A and protein kinase CK2 during culture growth in *Yarrowia lipolytica* in relation to glycogen metabolism," *Biochemistry*, vol. 323, pp. 257–266, 2000.

- [119] S. Klein *et al.*, “The phosphorylation of PDX-1 by protein kinase CK2 is crucial for its stability,” *Pharmaceuticals*, vol. 10, no. 1, pp. 1–13, 2016.
- [120] R. Meng, C. Götz, and M. Montenarh, “The role of protein kinase CK2 in the regulation of the insulin production of pancreatic islets,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 401, pp. 203–206, 2010.
- [121] S. Welker *et al.*, “Glucose regulates protein kinase CK2 in pancreatic  $\beta$ -cells and its interaction with PDX-1,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 45, pp. 2786–2795, 2013.
- [122] M. Rossi *et al.*, “CK2 acts as a potent negative regulator of receptor-mediated insulin release in vitro and in vivo,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, pp. E6818–E6824, 2015.
- [123] A. Duttaroy *et al.*, “Muscarinic stimulation of pancreatic insulin and glucagon release is abolished in M3 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice,” *Diabetes*, vol. 53, pp. 1714–1720, 2004.
- [124] P. Gilon and J. C. Henquin, “Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic  $\beta$ -cell function,” *Endocr. Rev.*, vol. 22, pp. 565–604, 2001.
- [125] I. Torrecilla *et al.*, “Phosphorylation and regulation of a G protein-coupled receptor by protein kinase CK2,” *J. Cell Biol.*, vol. 177, pp. 127–137, 2007.
- [126] N. Schuster *et al.*, “Wild-type p53 inhibits protein kinase CK2 activity,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 81, pp. 172–183, 2001.
- [127] M. Faust, N. Schuster, and M. Montenarh, “Specific binding of protein kinase CK2 catalytic subunits to tubulin,” *FEBS Lett.*, vol. 462, pp. 51–56, 1999.
- [128] H. E. Hohmeier *et al.*, “Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive  $K^+$  channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion,” *Diabetes*, vol. 49, pp. 424–430, 2000.
- [129] T. C. Lorenz, “Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies,” *J. Vis. Exp.*, vol. 63, p. e3998, 2012.
- [130] P. Y. Lee *et al.*, “Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments,” *J. Vis. Exp.*, vol. 62, p. e3923, 2012.
- [131] D. Hanahan, “Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids,” *J. Mol. Biol.*, vol. 166, pp. 557–580, 1983.
- [132] U. K. Laemmli, “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4,” *Nature*, vol. 227, pp. 680–685, 1970.



- [133] D. R. Marshak and D. Carroll, "Synthetic peptide substrates for casein kinase II," *Methods Enzymol.*, vol. 200, pp. 134–156, 1991.
- [134] A. Desroches and J. B. Denault, "Caspase-7 uses RNA to enhance proteolysis of poly(ADP-ribose) polymerase 1 and other RNA-binding proteins," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 116, pp. 21521–21528, 2019.
- [135] A. Merglen *et al.*, "Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells," *Endocrinology*, vol. 145, pp. 667–678, 2004.
- [136] C. Kelly *et al.*, "Comparison of insulin release from MIN6 pseudoislets and pancreatic islets of Langerhans reveals importance of homotypic cell interactions," *Pancreas*, vol. 39, pp. 1016–1023, 2010.
- [137] E. Ampofo, "Die Proteinkinase CK2 , das Endoplasmatische Retikulum und ER-Stress : Die Rolle der CK2 am größten Zellorganell," 2012.
- [138] S. Spohrer, "Interaktionen der Proteinkinase CK2 mit den Transkriptionsfaktoren der USF-Familie in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas," 2016.
- [139] L. M. Schwind, "Die Rolle der Proteinkinase CK2 bei Differenzierungsprozessen," 2016.
- [140] S. Klein, "Die Interaktion von PDX-1 und CK2 unter dem Einfluss von Glucose in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas," 2014.
- [141] R. Meng, "Crosstalk between protein kinase CK2 and the transcription factor Pdx-1," 2010.
- [142] W. L. Chick *et al.*, "A transplantable insulinoma in the rat," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 74, pp. 628–632, 1977.
- [143] G. Cozza *et al.*, "The selectivity of CK2 inhibitor Quinalizarin: A reevaluation," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, pp. 1–10, 2015.
- [144] F. Pierre *et al.*, "Pre-clinical characterization of CX-4945, a potent and selective small molecule inhibitor of CK2 for the treatment of cancer," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 356, pp. 37–43, 2011.
- [145] J. Intemann *et al.*, "ER stress signaling in ARPE-19 cells after inhibition of protein kinase CK2 by CX-4945," *Cell. Signal.*, vol. 26, pp. 1567–1575, 2014.
- [146] G. Wang *et al.*, "Downregulation of CK2 induces apoptosis in cancer cells – A potential approach to cancer therapy," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 274, pp. 77–84, 2005.

- [147] S. Spohrer *et al.*, "Functional interplay between the transcription factors USF1 and PDX-1 and protein kinase CK2 in pancreatic  $\beta$ -cells," *Sci. Rep.*, vol. 7, pp. 1–17, 2017.
- [148] "<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=CX-4945&cntry=&state=&city=&dist=>." [Online]. Available: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=CX-4945&cntry=&state=&city=&dist=>. [Accessed: 05-Sep-2020].
- [149] J. J. Kahle *et al.*, "Comparison of an expanded ataxia interactome with patient medical records reveals a relationship between macular degeneration and ataxia," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 20, pp. 510–527, 2011.
- [150] K. Tomizawa *et al.*, "Cdk5/p35 regulates neurotransmitter release through phosphorylation and downregulation of P/Q-type voltage-dependent calcium channel activity," *J. Neurosci.*, vol. 22, pp. 2590–2597, 2002.
- [151] S. Rajagopal *et al.*, "Stimulatory and inhibitory effects of PKC isozymes are mediated by serine/threonine PKC sites of the  $\text{Ca}_v2.3\alpha1$  subunits," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 621, pp. 24–30, 2017.
- [152] C. Götz *et al.*, "Identification of a CK2 phosphorylation site in mdm2," *Eur. J. Biochem.*, vol. 266, pp. 493–501, 1999.
- [153] W. Tegge *et al.*, "Determination of cyclic nucleotide-dependent protein kinase substrate specificity by the use of peptide libraries on cellulose paper," *Biochemistry*, vol. 34, pp. 10569–10577, 1995.
- [154] J. L. Parsons *et al.*, "XRCC1 phosphorylation by CK2 is required for its stability and efficient DNA repair," *DNA Repair (Amst.)*, vol. 9, pp. 835–841, 2010.
- [155] R. Felix and N. Weiss, "Ubiquitination and proteasome-mediated degradation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels and potential pathophysiological implications," *Gen. Physiol. Biophys.*, vol. 36, pp. 1–5, 2017.
- [156] S. Corre and M. D. Galibert, "Upstream stimulating factors: Highly versatile stress-responsive transcription factors," *Pigment Cell Res.*, vol. 18, pp. 337–348, 2005.
- [157] S. Lupp *et al.*, "The upstream stimulatory factor USF1 is regulated by protein kinase CK2 phosphorylation," *Cell. Signal.*, vol. 26, pp. 2809–2817, 2014.
- [158] Y. C. Lan *et al.*, "Effects of casein kinase 2 alpha 1 gene expression on mice liver susceptible to type 2 diabetes mellitus and obesity," *Int. J. Med. Sci.*, vol. 17, pp. 13–20, 2020.

- [159] J. C. Henquin, "Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose," *Diabetes*, vol. 49, pp. 1751–1760, 2000.
- [160] M. A. Lorenz *et al.*, "Metabolome response to glucose in the  $\beta$ -cell line INS-1832/13," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, pp. 10923–10935, 2013.
- [161] W. S. Zawalich, H. Yamazaki, and K. C. Zawalich, "Biphasic insulin secretion from freshly isolated or cultured, perfused rodent islets: Comparative studies with rats and mice," *Metabolism*, vol. 57, pp. 30–39, 2008.
- [162] G. Cozza *et al.*, "Quinalizarin as a potent, selective and cell-permeable inhibitor of protein kinase CK2," *Biochem. J.*, vol. 421, pp. 387–395, 2009.
- [163] A. Siddiqui-Jain *et al.*, "CX-4945, an orally bioavailable selective inhibitor of protein kinase CK2, inhibits prosurvival and angiogenic signaling and exhibits antitumor efficacy," *Cancer Res.*, vol. 70, pp. 10288–10298, 2010.
- [164] C. Franchin *et al.*, "Quantitative analysis of a phosphoproteome readily altered by the protein kinase CK2 inhibitor quinalizarin in HEK-293T cells," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1854, pp. 609–623, 2015.
- [165] R. Battistutta *et al.*, "Unprecedented selectivity and structural determinants of a new class of protein kinase CK2 inhibitors in clinical trials for the treatment of cancer," *Am. Chem. Soc.*, vol. 50, pp. 8478–8488, 2011.
- [166] S. Sarno *et al.*, "ATP site-directed inhibitors of protein kinase CK2: An update," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 11, pp. 1340–1351, 2011.
- [167] H. Kim *et al.*, "Identification of a novel function of CX-4945 as a splicing regulator," *PLoS One*, vol. 9, p. e94978, 2014.
- [168] Sarno *et al.*, "Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2')," vol. 496, pp. 44–48, 2001.
- [169] S. Spohrer *et al.*, "The nuclear fraction of protein kinase CK2 binds to the upstream stimulatory factors (USFs) in the absence of DNA," *Cell. Signal.*, vol. 28, no. 2, pp. 23–31, 2016.
- [170] C. C. Schneider *et al.*, "Modified tetrahalogenated benzimidazoles with CK2 inhibitory activity are active against human prostate cancer cells LNCaP in vitro," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 20, pp. 4390–4396, 2012.
- [171] S. Dembla *et al.*, "Anti-nociceptive action of peripheral  $\mu$ -opioid receptors by G-beta-gamma protein-mediated inhibition of TRPM3 channels," *Elife*, vol. 6, p. e26280, 2017.

- [172] S. Dembla *et al.*, "Transient receptor potential A1 channels regulate epithelial cell barriers formed by MDCK cells," *FEBS Lett.*, vol. 590, pp. 1509–1520, 2016.
- [173] C. B. Wollheim and G. W. Sharp, "Regulation of insulin release by calcium," *Physiol. Rev.*, vol. 61, pp. 914–973, 1981.
- [174] X. Wei *et al.*, "Modification of  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity by deletions at the carboxyl terminus of the cardiac  $\alpha 1$  subunit," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, pp. 1635–1640, 1994.
- [175] T. Gao *et al.*, "C-terminal fragments of the  $\alpha 1\text{C}$  ( $\text{Ca}_v1.2$ ) subunit associate with and regulate L-type calcium channels containing C-terminal-truncated  $\alpha 1\text{C}$  subunits," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, pp. 21089–21097, 2001.
- [176] J. T. Hulme *et al.*, "Autoinhibitory control of the  $\text{Ca}_v1.2$  channel by its proteolytically processed distal C-terminal domain," *J. Physiol.*, vol. 576, pp. 87–102, 2006.
- [177] F. Lebrin *et al.*, "CK2 $\alpha$  — protein phosphatase 2A molecular complex: Possible interaction with the MAP kinase pathway," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 191, pp. 207–212, 1999.
- [178] J. M. Crudele and J. S. Chamberlain, "Cas9 immunity creates challenges for CRISPR gene editing therapies," *Nat. Commun.*, vol. 9, p. 3497, 2018.
- [179] C. Borgo *et al.*, "Generation and quantitative proteomics analysis of CK2 $\alpha/\alpha'$ (-/-) cells," *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 42409, 2017.
- [180] B. Boldyreff and O. G. Issinger, "A-Raf kinase is a new interacting partner of protein kinase CK2  $\beta$  subunit," *FEBS Lett.*, vol. 403, pp. 197–199, 1997.
- [181] T. Mueller *et al.*, "CK2-dependent phosphorylation determines cellular localization and stability of ataxin-3," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 18, pp. 3334–3343, 2009.
- [182] S. J. Fu *et al.*, "Ubiquitin ligase RNF138 promotes episodic ataxia type 2-associated aberrant degradation of human  $\text{Ca}_v2.1$  (P/Q-type) calcium channels," *J. Neurosci.*, vol. 37, pp. 2485–2503, 2017.
- [183] J. R. Thomas and A. Lee, "Measuring  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent modulation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}_v$ ) channels in HEK-293T cells," *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 9, pp. 1–9, 2016.
- [184] J. Sommercorn *et al.*, "Activation of casein kinase II in response to insulin and to epidermal growth factor," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 84, pp. 8834–8838, 1987.
- [185] J. Rettig *et al.*, "Isoform-specific interaction of the  $\alpha 1\text{A}$  subunits of brain  $\text{Ca}^{2+}$  channels with the presynaptic proteins syntaxin and SNAP-25," *Proc. Natl. Acad. Sci.*,

- vol. 93, pp. 7363–7368, 1996.
- [186] Z. H. Sheng *et al.*, “Calcium-dependent interaction of N-type calcium channels with the synaptic core complex,” *Nature*, vol. 379, pp. 451–454, 1996.
  - [187] C. T. Yokoyama, Z. H. Sheng, and W. A. Catterall, “Phosphorylation of the synaptic protein interaction site on N-type calcium channels inhibits interactions with SNARE proteins,” *J. Neurosci.*, vol. 17, pp. 6929–6938, 1997.
  - [188] X. Du *et al.*, “A second cistron in CACNA1A gene encodes a transcription factor mediating cerebellar development and SCA6,” *Cell*, vol. 154, pp. 118–133, 2013.
  - [189] E. Bourinet *et al.*, “Splicing of  $\alpha 1A$  subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels,” *Nat. Neurosci.*, vol. 2, pp. 407–415, 1999.
  - [190] S. Kanumilli *et al.*, “Alternative splicing generates a smaller assortment of  $Ca_v2.1$  transcripts in cerebellar Purkinje cells than in the cerebellum,” *Physiol. Genomics*, vol. 24, pp. 86–96, 2005.
  - [191] T. Sakurai *et al.*, “Immunochemical identification and differential phosphorylation of alternatively spliced forms of the  $\alpha 1A$  subunit of brain calcium channels,” *J. Biol. Chem.*, vol. 270, pp. 21234–21242, 1995.
  - [192] H. B. Kordasiewicz *et al.*, “C-termini of P/Q-type  $Ca^{2+}$  channel  $\alpha 1A$  subunits translocate to nuclei and promote polyglutamine-mediated toxicity,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 15, pp. 1587–1599, 2006.
  - [193] T. Kubodera *et al.*, “Proteolytic cleavage and cellular toxicity of the human  $\alpha 1A$  calcium channel in spinocerebellar ataxia type 6,” *Neurosci. Lett.*, vol. 341, pp. 74–78, 2003.
  - [194] C. F. Fletcher *et al.*, “Absence epilepsy in tottering mutant mice is associated with calcium channel defects,” *Cell*, vol. 87, pp. 607–617, 1996.
  - [195] E. Wappl *et al.*, “Functional consequences of P/Q-type  $Ca^{2+}$  channel  $Ca_v2.1$  missense mutations associated with episodic ataxia type 2 and progressive ataxia,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, pp. 6960–6966, 2002.

## 9. Publikationen

C. Servas, S. Kiehlmeier, J. Hach, **R. Gross**, C. Götz, und M. Montenarh. The mammalian STE20-like kinase 1 (MST1) is a substrate for the apoptosis inhibiting protein kinase CK2. *Cell Signal.*, vol. 36, pp. 163 - 175, 2017.

S. Spohrer, **R. Gross**, L. Nalbach, L. Schwind, H. Stumpf, M. D. Menger, E. Ampofo, M. Montenarh und C. Götz. Functional interplay between the transcription factors USF1 and PDX-1 and protein kinase CK2 in pancreatic beta cells. *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 16367, 2017.

**R. Scheuer**, S. E. Phillipp, A. Becker, L. Nalbach, E. Ampofo, M. Montenarh und C. Götz. Protein kinase CK2 controls  $Ca_v2.1$ -dependent calcium currents and insulin release in pancreatic  $\beta$ -cells. *Int. J. Mol. Sci.*, vol.21, p. 4668, 2020.

## Danksagung

Ein besonderes Dankeschön gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Claudia Götz für Ihre Bereitschaft mich während meiner Promotion zu betreuen. Danke für die stetige Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung das Ziel auch in schwierigen Zeiten nicht aus den Augen zu verlieren. Danke für das Mitleiden und Mitfreuen während der Arbeit. Auch Herrn Prof. Dr. Mathias Montenarh möchte ich besonders danken. Sie waren ein wertvoller Ansprechpartner und die regelmäßigen Gespräche mit Ihnen haben enorm dazu beigetragen mein wissenschaftliches Denken zu prägen. Danke für Ihr stets offenes Ohr und Ihre Unterstützung.

Bei Herrn Prof. Dr. Peter Lipp bedanke ich mich für die Übernahme der Zweitberichterstattung dieser Arbeit.

Zudem möchte ich mich bei Herrn PD. Dr. Stephan Philipp und insbesondere bei Alexander Becker für die Nutzung der Geräte bedanken. Danke Alexander für deine stete Hilfsbereitschaft und Diskussionsbereitschaft und besonders für die Einarbeitung und Weitergabe deines Wissens.

Des Weiteren möchte ich allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Montenarh für die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre sowie der Hilfs- und Diskussionsbereitschaft danken.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Gabi und Eva für die emotionale Unterstützung und die viele Schokolade! Ihr habt vieles leichter gemacht!

Ebenfalls besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Emmanuel Ampofo, Frau Beate Schmitt und Frau Lisa Nalbach für die Bereitstellung der murinen Inseln und vor allem für die experimentelle und wissenschaftliche Unterstützung. Vielen Dank für die angeregten wissenschaftlichen Diskussion und für die neuen Denkanstöße.

Besonderer Dank gilt meinen Freunden. Auch wenn sie sich nur schwer vorstellen können, womit ich in den letzten Jahren meine Zeit verbracht habe, hatten sie immer ein offenes Ohr für mich und haben stets an mich geglaubt. Meinem Freund Benjamin danke ich von Herzen für seine Unterstützung und sein Verständnis.

Der größte Dank geht an meine jetzt offizielle Mutter Rosel Scheuer. Ohne dich wäre das Studium und die Promotion überhaupt nicht möglich gewesen. Danke dass du immer für mich da bist und hinter mir stehst. Danke, dass du mir ein Zuhause gegeben hast, zu dem ich immer zurückkehren kann, komme was wolle.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.